

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie  
der Medizinischen Fakultät der Universität des  
Saarlandes, Homburg/Saar  
(Direktor: Prof. Dr. med. M. D. Menger)

**Isolierte mikrovaskuläre Fragmente aus  
Fettgewebe zur Vaskularisierung von  
Scaffolds für das Tissue Engineering**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
Doktors an der Medizinischen Fakultät der  
Universität des Saarlandes**

**2018**

vorgelegt von: Christian Gräßer  
geboren am 24.05.1990 in Homburg/Saar

***In großer Dankbarkeit meiner Familie gewidmet***

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	1
<b>2. SUMMARY</b>	3
<b>3. EINLEITUNG</b>	5
<b>3.1. Tissue Engineering</b>	5
<b>3.2. Scaffolds</b>	6
<b>3.3. Vaskularisierung im Tissue Engineering</b>	7
3.3.1. Vaskularisierung durch Angiogenese	8
3.3.2. Vaskularisierung durch Inoskulation	9
<b>3.4. Mikrovaskuläre Fragmente aus Fettgewebe</b>	10
<b>3.5. Vaskularisierung von Scaffolds mit macrophage-activating lipopeptide 2 (MALP-2)</b>	11
<b>4. ZIELE DER STUDIE</b>	13
<b>5. MATERIAL UND METHODIK</b>	14
<b>5.1. Versuchstiere</b>	14
<b>5.2. Generierung prävaskularisierter Scaffolds</b>	14
5.2.1. Herstellung der Scaffolds	14
5.2.2. Isolierung der Gefäßfragmente	15
5.2.3. Besiedlung der Scaffolds	16
<b>5.3. Das Modell der Rückenhautkammer</b>	18
5.3.1. Implantation der Rückenhautkammer	19
5.3.2. Implantation von Scaffolds in die Rückenhautkammer	21
5.3.3. Applikation von MALP-2 in die Rückenhautkammer	22
<b>5.4. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie</b>	22
5.4.1. Durchführung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie	22

5.4.2. Mikrozirkulatorische Parameter.....	24
5.4.3. Mikrohämodynamik der perfundierten Gefäße.....	25
5.4.3.1. Gefäßdurchmesser.....	25
5.4.3.2. Blutzellgeschwindigkeit.....	25
5.4.3.3. Scherrate.....	26
5.4.4. Leukozytäre Entzündungsreaktion.....	26
<b>5.5. Histologie und Immunhistochemie.....</b>	<b>27</b>
5.5.1. Histologie.....	27
5.5.2. Immunhistochemie.....	27
5.5.3. In vitro Analyse der mikrovaskulären Fragmente.....	28
5.5.3.1. Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA).....	28
5.5.3.2. Durchflusszytometrische Analyse .....	29
<b>5.6. Experimentelles Protokoll.....</b>	<b>29</b>
<b>5.7. Versuchsgruppen.....</b>	<b>30</b>
<b>5.8. Statistik.....</b>	<b>31</b>
<b>6. ERGEBNISSE.....</b>	<b>32</b>
<b>6.1. Vaskularisierung implantierter Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus adulten und alten Spendermäusen.....</b>	<b>32</b>
6.1.1. Isolierung der Gefäßfragmente und Besiedlung der Scaffolds.....	32
6.1.2. Vaskularisierung implantierter Scaffolds.....	33
6.1.3. Mikrohämodynamik in den Gefäßnetzwerken implantierter Scaffolds .....	35
6.1.4. Inkorporation und Inoskulation implantierter Scaffolds.....	35
6.1.5. Kultivierung mikrovaskulärer Fragmente unter hypoxischen Bedingungen.....	37
6.1.6. Durchflusszytometrische Analyse mikrovaskulärer Fragmente.....	40
<b>6.2. Vaskularisierung implantierter Scaffolds nach lokaler Applikation von MALP-2.....</b>	<b>40</b>
6.2.1. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion.....	40
6.2.2. Vaskularisierung implantierter Scaffolds.....	43
6.2.3. Mikrohämodynamik in den Gefäßnetzwerken implantierter Scaffolds.....	44

6.2.4. Inkorporation und Inoskulation implantierter Scaffolds.....	46
6.2.5. Effekt von MALP-2 auf die Viabilität isolierter Gefäßfragmente.....	48
<b>6.3. Zusammenfassung der Ergebnisse.....</b>	<b>49</b>
<b>7. DISKUSSION.....</b>	<b>51</b>
7.1. Diskussion von Material und Methodik.....	51
7.1.1. Modell der Rückenhautkammer.....	51
7.1.2. Scaffolds.....	52
7.1.3. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie.....	53
<b>7.2. Diskussion der Ergebnisse.....</b>	<b>55</b>
7.2.1. Vaskularisierung implantierter Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus adulten und alten Spendermäusen.....	55
7.2.2. Vaskularisierung implantierter Scaffolds nach lokaler Applikation von MALP-2.....	59
<b>7.3. Schlussfolgerungen und klinische Perspektiven.....</b>	<b>61</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>63</b>
<b>9. DANKSAGUNG.....</b>	<b>77</b>
<b>10. PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>78</b>

# 1. Zusammenfassung

Das Ziel des Tissue Engineerings ist es, ein funktionsfähiges Ersatzgewebe zu generieren. Hierzu werden Zellen auf eine Trägermatrix (Scaffold) übertragen und anschließend in einen Gewebedefekt implantiert. Wesentlich für das Überleben eines solchen Gewebekonstrukts ist eine effiziente Blutversorgung, um eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen zu gewährleisten. Das Einwachsen von Blutgefäßen aus dem umliegenden Gewebe in das Implantat ist jedoch oftmals nicht ausreichend, um eine frühzeitige Durchblutung sicherzustellen. Aus diesem Grund wurde kürzlich eine neue Methode etabliert, bei der die Vaskularisierung von Scaffolds durch die Besiedlung mit Gefäßfragmenten aus Spenderfettgewebe deutlich verbessert werden kann. So verbinden sich die Gefäßfragmente schnell zu einem neuen Gefäßnetzwerk, welches mittels Inoskulation Anschluss an das Gefäßsystem des umliegenden Gewebes herstellt.

Aufgrund des demographischen Wandels werden in Zukunft besonders ältere Menschen auf das Tissue Engineering angewiesen sein. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals untersucht, inwiefern die Fähigkeit isolierter Gefäßfragmente, neue Gefäßnetzwerke auszubilden, vom Alter des Fettgewebsspenders abhängig ist. Hierzu wurden aus dem Nebenhodenfettgewebe von 8- bzw. 16- Monate alten C57BL/6-Spendermäusen Gefäßfragmente isoliert, auf Scaffolds übertragen und dann in die Rückenhautkammern von 3 - 4 Monate alten C57BL/6-Empfängermäusen implantiert. Die Vaskularisierung der Scaffolds wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen mithilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie, histologischen und immunhistochemischen Verfahren analysiert.

Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus alten Spendermäusen eine signifikant niedrigere funktionelle Kapillardichte aufwiesen und schlechter perfundiert wurden als Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus adulten Spendermäusen. Die neu gebildeten Gefäßnetzwerke innerhalb der Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus alten Spendermäusen waren zudem schlechter ausgereift.

Weiterhin zeigte sich bei immunhistochemischer Detektion von CD31/ $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA)-positiven Blutgefäßen eine deutlich geringere Gefäßdichte in diesen Scaffolds.

Hieraus lässt sich schließen, dass Gefäßfragmente alter Spendermäuse über ein reduziertes Vaskularisierungspotential im Vergleich zu Gefäßfragmenten adulter Spendermäuse verfügen. Das Alter der Fettgewebsspender hat dabei einen entscheidenden Einfluss auf die Ausreifung der Gefäßnetzwerke.

Durch die Besiedlung von Scaffolds mit isolierten Gefäßfragmenten kann eine adäquate Blutperfusion im Inneren der Scaffolds erst nach 6 bis 10 Tagen erreicht werden. In einem zweiten Studienabschnitt wurde daher untersucht, ob die lokale Applikation des pro-angiogenen Faktors macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) das Einwachsen von Blutgefäßen in die Scaffolds beschleunigt und somit die frühzeitige Vaskularisierung der Scaffolds verbessert. Hierzu wurde das Deckglas der Rückenhautkammer 30 Minuten vor Implantation der Scaffolds entfernt und Vehikel oder MALP-2 lokal auf das Gewebe appliziert. Anschließend wurde die Vaskularisierung der Scaffolds und die leukozytäre Entzündungsreaktion über einen Zeitraum von 14 Tagen mithilfe der repetitiven intravitalen Fluoreszenzmikroskopie, histologischen und immunhistochemischen Verfahren analysiert.

Die Anzahl adhärenter Leukozyten in Venolen der Rückenhautkammer war in der MALP-2-Gruppe in den ersten 3 Tagen nach Applikation signifikant erhöht. Zudem zeigte sich bei immunhistochemischer Detektion von CD31/SMA-positiven Blutgefäßen eine erhöhte Gefäßdichte im Gewebe um die Implantate. Im Gegensatz dazu war das Zentrum der Scaffolds in der MALP-2-Gruppe weniger stark vaskularisiert und wies eine geringere funktionelle Kapillardichte als in der Kontroll-Gruppe auf. Dies war dadurch bedingt, dass MALP-2 in den perivaskulären Zellen und Endothelzellen der isolierten Gefäßfragmente Apoptose induzierte.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass MALP-2 die angiogene Reaktion des Kammergewebes auf implantierte Scaffolds verbessert, aber die Ausreifung eines adäquaten Gefäßnetzwerkes in Gefäßfragment-besiedelten Implantaten verhindert. Die lokale Applikation von MALP-2 in Verbindung mit isolierten Gefäßfragmenten ist somit nicht für zukünftige klinische Anwendungen zu empfehlen.

## 2. Summary

The aim of tissue engineering is the generation of functional tissue substitutes. For this purpose cells are seeded on a matrix (scaffold), which is subsequently implanted into a tissue defect. A major prerequisite for the survival of such a tissue construct is an efficient vascularization, which guarantees an adequate supply with oxygen and nutrients. However, the ingrowth of newly formed blood vessels from the surrounding tissue into the implant is often not sufficient enough to induce a rapid vascularization. Therefore, a new prevascularization approach has recently been introduced, seeding scaffolds with adipose tissue-derived microvascular fragments. These microvascular fragments rapidly reassemble into functional microvascular networks within the implants and develop interconnections to the host microvasculature.

Elderly patients are the major future target population for tissue engineering applications due to an increasing human life expectancy. Therefore, the first aim of this thesis was to investigate whether aging of the donor influences the fragments' vascularization capacity. To study this, microvascular fragments were isolated from the epididymal fat pads of adult (8 months) and aged (16 months) C57BL/6 donor mice. These fragments were seeded onto scaffolds, which were implanted into dorsal skinfold chambers of 3 - 4 month old C57BL/6 recipient mice. The vascularization of the scaffolds was analyzed by means of intravital fluorescence microscopy, histology and immunohistochemistry over an observation period of 14 days.

Scaffolds seeded with the fragments from the aged donors exhibited a significantly lower functional microvessel density and an impaired blood perfusion when compared to scaffolds seeded with fragments from adult donors. This was associated with an impaired vessel maturation. The immunohistochemical detection of CD31/  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA)-positive microvessels revealed a markedly decreased microvessel density in the tissue surrounding the implants.

These findings indicate that microvascular fragments from aged donors exhibit a reduced vascularization capacity when compared to microvascular fragments from



adult donors. Thereby, the age of the fat donors crucially determines the maturation of the newly developing microvasculature.

By seeding of scaffolds with microvascular fragments an adequate blood perfusion can only be observed after 6-10 days in the center of the implants. Therefore, the second aim of this thesis was to analyze whether a single application of the pro-angiogenic factor macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) at the implantation site may further accelerate the vascularization of the constructs. For this purpose, MALP-2 or vehicle (control) were locally applied on the exposed tissue 30 minutes before the implantation of the Scaffolds. The vascularization of the scaffolds and the inflammatory host tissue response were analyzed by means of intravital fluorescence microscopy, histology, and immunohistochemistry.

MALP-2 chambers showed a significantly increased number of adherent leukocytes in venules during the first 3 days after application. Furthermore, the immunohistochemical detection of CD31/SMA-positive microvessels revealed an increased microvessel density in the tissue surrounding the implants. In contrast, the vascularization of the scaffolds' center was reduced, as indicated by a decreased microvessel density when compared to the control group. This was caused by the fact that MALP-2 induced apoptotic cell death of the endothelial and perivascular cells in isolated microvascular fragments.

In summary, these results show that the angiogenic host tissue response is improved by MALP-2 application. However, the vascularization capacity of microvascular fragments is impaired. Accordingly, the simultaneous use of MALP-2 and isolated microvascular fragments can not be recommended for future clinical applications.

### 3. Einleitung

Die regenerative Medizin beschäftigt sich mit dem Ersatz oder der Wiederherstellung von Zell-, Gewebe- und Organfunktionen [Mao und Mooneya, 2015]. Eine der größten Herausforderungen der regenerativen Medizin ist die Herstellung eines Ersatzgewebes, das über eine gute Gewebeverträglichkeit und über möglichst identische physikalische und physiologische Eigenschaften wie das körpereigene Gewebe verfügt. Aufgrund der besseren Immunkompatibilität sollte bei der Generierung neuer Ersatzgewebe bevorzugt autologes Spendermaterial verwendet werden.

#### 3.1. Tissue Engineering

Das Tissue Engineering ist ein Teilbereich der regenerativen Medizin, der sich primär mit der Herstellung geeigneter Ersatzgewebe beschäftigt. Das grundlegende Prinzip des Tissue Engineerings besteht darin, dem Patienten Zellen zu entnehmen und in vitro zu vermehren. Die Zellen werden anschließend auf eine dreidimensionale Trägermatrix, ein sogenanntes Scaffold, gesiedelt [Langer und Vacanti, 1993; Stoltz et al., 2006]. Das so entstandene Gewebekonstrukt kann schließlich in einen Gewebedefekt des Patienten implantiert werden.

Das Tissue Engineering bietet in der klinischen Praxis bereits erste Möglichkeiten zur Behandlung von Hautdefekten, Knorpelschäden, Knochenfrakturen oder diabetischen Fußulzera [Mao und Mooneya, 2015]. Weiterhin gibt es neue Ansätze zur verbesserten Langzeitkultivierung insulinproduzierender Inselzellen, die zur Behandlung von TYP I Diabetes verwendet werden [Daoud et al., 2011]. Zur Behandlung von akuten Erkrankungen wie Myokardinfarkten besteht die Möglichkeit, Hydrogele in die Infarktzone zu injizieren. Die morphologischen und biochemischen Eigenschaften der injizierten Hydrogele können das Einwachsen von Zellen und das Remodeling des infarzierten Gewebes verbessern [Johnson und Christman, 2013]. Zusätzlich können Scaffolds auch mit Stammzellen oder Wachstumsfaktoren

bioaktiviert werden, um die Funktion der Herzmuskelzellen wieder herzustellen [Wang und Guan, 2010].

### 3.2. Scaffolds

Scaffolds werden als dreidimensionale Trägermatrices zur Herstellung von Gewebekonstrukten verwendet. Diese können aus natürlichen Materialien wie Kollagen [Freyman et al., 2001] oder Alginat [Marijnissen et al., 2002], aber auch aus synthetischen Materialien wie Polylactic-co-Glycolid (PLGA) [Druecke et al., 2004], Hydrogelen [Holland et al., 2005], Keramiken und Metallen [Ducheyne und Qiu, 1999; Mastrogiacomo et al., 2005] hergestellt werden.

Scaffolds sind die struktur- und formgebenden Elemente von Gewebekonstrukten und gleichzeitig für deren mechanische Eigenschaften wie Härte oder Elastizität verantwortlich. Durch ihre Oberflächenbeschaffenheit können Scaffolds die darauf besiedelten Zellen zum Proliferieren und Differenzieren anregen [Ghasemi-Mobarakeh et al., 2015]. Die Dreidimensionalität und Porosität der Scaffolds bieten den Zellen zudem die Möglichkeit, diese zu infiltrieren [Chan und Leong, 2008]. Idealerweise sind Scaffolds vom Empfängerorganismus abbaubar und können dauerhaft durch autologes Gewebe ersetzt werden [Agrawal und Ray, 2001]. Außerdem gibt es die Möglichkeit, Scaffolds als Trägermatrices für verschiedene Wachstumsfaktoren zu nutzen [Bose und Tarafder, 2012; Vo et al., 2012].

Die zur Herstellung von Scaffolds verwendeten Methoden haben einen großen Einfluss auf die chemischen und physikalischen Eigenschaften von Gewebekonstrukten und somit auch auf deren Anwendungsbereich. Die Größe der Poren innerhalb der Scaffolds ist dabei ein entscheidender Faktor für das Einwachsen neuer Blutgefäße in das Ersatzgewebe [Druecke et al., 2004]. Unterscheidet sich die Größe benachbarter Poren beispielsweise signifikant in ihrem Durchmesser, erschwert dies das Einwachsen neuer Blutgefäße [Temenoff und Mikos, 2000]. Um eine gleichmäßige Porengröße sicherzustellen, wurde in dieser Arbeit die Salz-Auswasch-Umkehr-Methode zur Herstellung von Scaffolds verwendet [Gorna und Gogolewski, 2006; Boissard et al., 2009]. Die so angefertigten Hydroxylapatit-Nanopartikel-beschichteten Poly(Esther-Urethan)-Scaffolds (nHA/PU-Scaffolds) hatten eine Porengröße von 220 µm bei einer Porosität von 90 %. In früheren

Studien konnte bereits gezeigt werden, dass diese Materialeigenschaften das Einwachsen von Gefäßen und Granulationsgewebe aus dem umliegenden Gewebe in die Scaffolds fördert [Druecke et al., 2004; Laschke et al., 2010a; Laschke et al., 2011]. Zusätzlich verfügen nHA/PU-Scaffolds über eine ausgezeichnete in vivo Biokompatibilität [Laschke et al., 2010b].

### 3.3. Vaskularisierung im Tissue Engineering

Eine effiziente Vaskularisierung ist für das Überleben und den Funktionserhalt implantierter Gewebekonstrukte unerlässlich [Novosel et al., 2011; Auger et al., 2013; Rouwkema und Khademhosseini, 2016]. Metabolisch weniger anspruchsvolle Gewebe, wie Knorpel, oder sehr dünne Gewebekonstrukte, wie Haut, können per Sauerstoffdiffusion versorgt werden. Da dies jedoch nur auf Zellen mit einem maximalen Abstand von 200 µm zum nächsten Blutgefäß zutrifft [Folkman und Hochberg, 1973; Colton, 1995], ist Diffusion alleine nicht zur Versorgung größerer dreidimensionaler Gewebekonstrukte, wie z.B. Knochenersatzgewebe, geeignet. Größere Gewebekonstrukte sind auf die Ausbildung eigener mikrovaskulärer Gefäßnetzwerke angewiesen [Santos und Reis, 2010; Auger et al., 2013]. Aufgrund der Entwicklung und Herstellung von immer größeren und komplexeren Gewebekonstrukten bedarf es damit auch neuer, effizienter und klinisch anwendbarer Vaskularisierungsstrategien.

Bei dem Versuch, die Vaskularisierung implantierter Scaffolds zu verbessern, werden grundsätzlich zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Einerseits wird die Vaskularisierung von Implantaten durch die Stimulation der Angiogenese verbessert, d.h. durch das Einwachsen von Blutgefäßen aus dem Empfängergerewebe [Laschke et al., 2006a]. Beim zweiten Ansatz muss lediglich ein im Inneren des Scaffolds präformiertes Gefäßnetzwerk eine Verbindung zu den Gefäßen des umliegenden Gewebes herstellen, was man auch als Inoskulation bezeichnet [Laschke et al., 2009a].

### 3.3.1. Vaskularisierung durch Angiogenese

Als Angiogenese bezeichnet man den Prozess, bei dem neue Gefäße aus bereits bestehenden Blutgefäßen entstehen [Laschke et al., 2006a]. Daran sind sowohl humorale als auch zelluläre Mechanismen beteiligt [Risau, 1997; Carmeliet, 2000]. Blutgefäße werden durch pro-angiogene Wachstumsfaktoren zur Angiogenese angeregt. Freigesetzte Matrix-Metalloproteinasen (MMP) lösen die umliegende Basalmembran der Gefäße enzymatisch und machen sie dadurch für Endothelzellen durchgängig. Die Migration dieser Zellen in das Interstitium führt zur Bildung von Gefäßsprossen. Die stetige Proliferation der Endothelzellen bewirkt, dass die Gefäßsprossen zu neuen Gefäßen heranwachsen. Zur Stabilisierung der neuen Gefäßwand ist ein komplexes Stützgewebe nötig. Dieses wird unter Beteiligung verschiedener Zellen, wie glatter Muskelzellen, Perizyten und Fibroblasten, ausgebildet. Zur weiteren Ausreifung des neu gebildeten Gefäßes muss zusätzlich extrazelluläres Bindegewebe produziert werden. Dies wird durch die Freisetzung bestimmter Zytokine und Wachstumsfaktoren induziert und gesteuert [Patan, 2004].

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Vaskularisierung implantierter Scaffolds mittels Angiogenese zu verbessern. Um das Einwachsen von Blutgefäßen zu beschleunigen, kann beispielsweise die chemische Zusammensetzung [Butler und Sefton, 2007; Rücker et al., 2008; Martin et al., 2010], die Architektur [Druecke et al., 2004; Mehdizadeh et al., 2015] oder die Oberflächenbeschaffenheit [Griffin et al., 2016] von Scaffolds modifiziert werden. Eine weitere Strategie zur Stimulation der Angiogenese ist die Applikation von Wachstumsfaktoren. Hierbei können Scaffolds selbst als Trägermatrices genutzt werden [Nillesen et al., 2007; Bose und Tarafder, 2012; Vo et al., 2012] oder eine topische Applikation von Wachstumsfaktoren an der Defektstelle erfolgen [Laschke et al., 2014a].

Bei der Vaskularisierung von dicken und metabolisch anspruchsvollen Gewebekonstrukten ist das alleinige Einwachsen von Blutgefäßen in die Scaffolds nicht ausreichend, um eine schnelle und effiziente Blutversorgung innerhalb der ersten Tage zu gewährleisten [Auger et al., 2013]. Dies liegt einerseits an der langsamen Wachstumsgeschwindigkeit neuer Blutgefäße von nur 5 µm pro Stunde [Zarem, 1969; Orr et al., 2003] und andererseits an der limitierten Diffusionsstrecke für Sauerstoff von maximal 200 µm [Folkman und Hochberg, 1973; Colton, 1995]. Es

bedarf somit neuer, innovativer Methoden, um die Vaskularisierung von Scaffolds zu beschleunigen.

### **3.3.2. Vaskularisierung durch Inoskulation**

Zur Vaskularisierung dicker und metabolisch anspruchsvoller Ersatzgewebe ist die Inoskulation eine vielversprechende Alternative zur Angiogenese [Laschke und Menger, 2012a]. Bei der Inoskulation muss lediglich ein im Inneren der Scaffolds präformiertes Gefäßnetzwerk mit den Gefäßen des umliegenden Gewebes anastomosieren [Tremblay et al. 2005; Laschke et al., 2008]. Die Herstellung eines präformierten Gefäßnetzwerkes wird auch als Prävaskularisierung bezeichnet [Laschke et al., 2009a]. Hierfür werden verschiedene Ansätze verfolgt. Die Prävaskularisierung kann durch die Besiedlung von Scaffolds mit Stammzellen oder Endothelzellen in vitro erfolgen [Koike et al., 2004; Dong et al., 2011]. Zur in situ Prävaskularisierung können Scaffolds in ein vaskularisiertes Gewebe implantiert werden, wo sich durch das Einwachsen von Blutgefäßen ein neues Gefäßnetzwerk innerhalb der Scaffolds ausbildet [Soltysiak und Saxena, 2009; Kokemueller et al., 2010]. Im nächsten Schritt werden die prävaskularisierten Scaffolds explantiert und in den eigentlichen Gewebedefekt transferiert. Bei einer weiteren Methode wird durch das Anlegen einer arterio-venösen Gefäßschleife eine in situ Prävaskularisierung der Scaffolds erzielt [Ren et al., 2008]. Dabei wird eine Vene und Arterie zu einer Gefäßschleife anastomosiert, die um ein Scaffold in einer implantierten Kammer gelegt wird. Die hohen Scherkräfte in der durchbluteten Gefäßschleife induzieren neue Gefäße, die in das Scaffold einwachsen.

Die beschriebenen Methoden zur in vitro und in situ Prävaskularisierung von Scaffolds gehen jedoch mit einem sehr hohen Zeitaufwand, teils sehr komplexen Zellkulturtechniken oder mehrfachen operativen Eingriffen einher. Eine mögliche Lösung des Problems ist die Besiedlung von Scaffolds mit Gefäßfragmenten vor der Implantation in einen Gewebedefekt [Hiscox et al., 2008; Laschke et al., 2012b; Pilia et al., 2014]. Hierzu werden aus Fettgewebe mikrovaskuläre Fragmente isoliert und auf Scaffolds gesiedelt, die sich dort zu einem neuen Gefäßnetzwerk zusammenschließen. Über Inoskulation findet dieses neue Gefäßnetzwerk dann auch Anschluss an das Gefäßsystem des umliegenden Gewebes, wodurch eine frühe Blutperfusion erzielt wird [Laschke et al., 2012b].

### 3.4. Mikrovaskuläre Fragmente aus Fettgewebe

Mikrovaskuläre Fragmente können innerhalb kürzester Zeit und in großer Anzahl mittels enzymatischer Verdauung aus Fettgewebe isoliert werden [Hoying et al., 1996; Shepherd et al., 2004; Nunes et al., 2010a]. Die gewonnenen arteriellen, kapillären und venösen Segmente besitzen eine typische Gefäßmorphologie, bestehend aus Endothelzellen, die das Lumen der Gefäße auskleiden, und aus perivaskulären Zellen, welche die Endothelzellen umgeben. Die isolierten Gefäßfragmente enthalten zudem mesenchymale Stammzellen (MSCs) und endotheliale Progenitorzellen (EPCs) [Laschke et al., 2012b; McDaniel et al., 2014]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass aus den Gefäßfragmenten Wachstumsfaktoren, wie vascular endothelial growth factor (VEGF) und basic fibroblast growth factor (bFGF), freigesetzt werden [Laschke et al., 2012b; Pilia et al., 2014]. Zur Anwendung in vivo mit dem Ziel der Verbesserung der Vaskularisierung werden die isolierten Gefäßfragmente auf ein Scaffold gesiedelt und anschließend in einen Gewebedefekt implantiert. Die Gefäßfragmente schließen sich dann zu einem neuen Gefäßnetzwerk zusammen, welches mittels Inoskulation Anschluss an das Gefäßsystem des umliegenden Gewebes herstellt.

Durch die einfache und schnelle Gewinnung von Fettgewebe via Liposuktion ist diese Methode zur Vaskularisierung von Ersatzgeweben auch gut zur klinischen Anwendung geeignet und könnte intraoperativ durchgeführt werden. Das Patientenkollektiv, das von einer solchen Methode profitieren könnte, ist jedoch sehr heterogen auf alle Altersschichten verteilt. Aufgrund des demographischen Wandels werden zukünftig vor allem ältere Patienten auf Tissue Engineering-Verfahren angewiesen sein [Choudhery et al., 2014]. Es stellt sich somit die Frage, ob das Alter des Fettgewebsspenders Auswirkungen auf das Vaskularisierungspotential isolierter Gefäßfragmente hat. In der vorliegenden Arbeit wurden daher Gefäßfragmente aus adulten (8 Monate) und alten (16 Monate) C57BL/6 Spendermäusen isoliert, auf Scaffolds gesiedelt und anschließend in 3 - 4 Monate alte C57BL/6 Empfängeräuse implantiert. Mit diesen Untersuchungen sollte das Vaskularisierungspotential dieser Gefäßfragmente in vivo analysiert werden.

### 3.5. Vaskularisierung von Scaffolds mit macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2)

In Vorarbeiten konnten *Laschke et al.* (2012b) zeigen, dass mit Gefäßfragmenten besiedelte Scaffolds besser vaskularisiert und perfundiert werden als unbesiedelte Kontroll-Scaffolds. Allerdings wird mit dieser Methode eine effiziente Vaskularisierung auch erst nach 6 - 10 Tagen erzielt. Es bedarf somit neuer Strategien, um die Blutperfusion Gefäßfragment-besiedelter Scaffolds noch weiter zu beschleunigen. Ein möglicher Ansatz könnte sein, über Stimulation das Einwachsen von Blutgefäßen in die Scaffolds und das Zusammenwachsen der Gefäßfragmente zu einem Gefäßnetzwerk zu beschleunigen und somit eine schnellere Perfusion der Scaffolds zu erreichen. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass die lokale Applikation des pro-angiogenen Faktors MALP-2 das frühe Einwachsen von Blutgefäßen in poröse Polyethylen- Scaffolds (Medpor®) fördert [*Laschke et al.*, 2014a].

MALP-2 wurde ursprünglich aus *Mycoplasma species* isoliert [*Mühlradt et al.*, 1997] und wurde bereits in einer Vielzahl von Studien zu Wundheilung [*Deiters et al.*, 2004; *Cole et al.*, 2007; *Grote et al.*, 2010], Sepsis und Infektionen [*Kerber-Momot et al.*, 2010; *Zeckey et al.*, 2010], Adjuvantien [*Rharbaoui et al.*, 2002; *Cataldi et al.*, 2008] und Tumorwachstum [*Shingu et al.*, 2003; *Schneider et al.*, 2004] analysiert. MALP-2 ist ein potenter Stimulator der Immunreaktion mit einem direkten toll-like Rezeptor (TLR) 2/6 vermittelten pro-angiogenen Effekt [*Grote et al.*, 2010], wobei MALP-2-exponierte Endothelzellen zur Proliferation, Migration und Gefäßneubildung angeregt werden. MALP-2 fördert zudem über den granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) [*Grote et al.*, 2010] die Reendothelialisierung von Gefäßen nach Verletzungen [*Grote et al.*, 2013a]. Zusätzlich sezernieren MSCs nach MALP-2 Applikation hohe Konzentrationen angiogener Wachstumsfaktoren wie VEGF [*Grote et al.*, 2013b], was zu einer parakrinen Stimulation der Angiogenese führt. Durch den pro-angiogenen Effekt von MALP-2 konnte die Wundheilung in diabetischen Mäusen verbessert werden [*Deiters et al.*, 2004]. In der Wundheilung wurde MALP-2 nicht nur in tierexperimentellen Studien untersucht. Vielmehr konnte auch in klinischen Phase I und Phase II Studien nachgewiesen werden, dass MALP-2 die lokale Wundheilung



fördert, ohne dabei systemische Nebenwirkungen zu verursachen [*Niebuhr et al.*, 2008].

Daher wurde in einem zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Applikation von MALP-2 auch die Vaskularisierung Gefäßfragment-besiedelter Scaffolds verbessert. Hierzu wurde MALP-2 30 Minuten vor Implantation der besiedelten Scaffolds lokal auf das Gewebe der Rückenhautkammer appliziert. Die leukozytäre Entzündungsreaktion in den Venolen der Rückenhautkammer, die Vaskularisierung der Scaffolds und der Effekt von MALP-2 auf die isolierten Gefäßfragmente wurden mithilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie sowie histologischen und immunhistochemischen Methoden untersucht.

## 4. Ziele der Studie

In einem ersten Studienabschnitt wurde das Vaskularisierungspotential isolierter Gefäßfragmente aus unterschiedlich alten Fettgewebsspendern untersucht. Dabei wurde auf die folgenden Fragen näher eingegangen:

1. Ist das Vaskularisierungspotential isolierter Gefäßfragmente durch hohes Alter des Fettgewebsspenders reduziert?
2. Ist die Anzahl von MSC's und EPC's in isolierten Gefäßfragmenten aus alten Fettgewebsspendern reduziert?
3. Induziert Hypoxie bei isolierten Gefäßfragmenten aus alten Fettgewebsspendern vermehrt apoptotischen Zelltod?

Das Ziel des zweiten Studienabschnitts war die Entwicklung einer einfachen, klinisch anwendbaren Methode zur Verbesserung der Vaskularisierung von Gefäßfragment-besiedelten Scaffolds. Dabei wurde auf die folgenden Fragen näher eingegangen:

4. Bewirkt die lokale Applikation von MALP-2 eine Stimulation der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in den Venolen der Rückenhautkammer?
5. Kann die Vaskularisierung implantierter Scaffolds durch die lokale Applikation von MALP-2 in vivo verbessert werden?
6. Fördert MALP-2 das angiogene Potential isolierter Gefäßfragmente?

## **5. Material und Methodik**

### **5.1. Versuchstiere**

Sämtliche Tierversuche wurden vom Landesamt des Saarlandes für Verbraucherschutz in Saarbrücken genehmigt und unter Berücksichtigung der NIH-Richtlinien durchgeführt [*NIH Publications #85 - 23 Rev.*, 1985]. Alle Tiere wurden in Einzelkäfigen bei 12-stündigem Tag/Nachtrhythmus in einem klimatisierten Raum gehalten und hatten zu jedem Zeitpunkt Zugang zu Wasser und Standardlaborfutter (Altromin, Lage, Deutschland). Zur Isolierung der Gefäßfragmente dienten C57BL/6 Spendermäuse (Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar, Deutschland). Die Gefäßfragmente wurden anschließend auf Scaffolds gesiedelt und in Rückenhautkammern implantiert. Die Rückenhautkammern wurden 48 Stunden zuvor in 3 - 4 Monate alte C57BL/6 Mäuse mit einem Gewicht von 22 - 26 g implantiert.

### **5.2. Generierung prävasikularisierter Scaffolds**

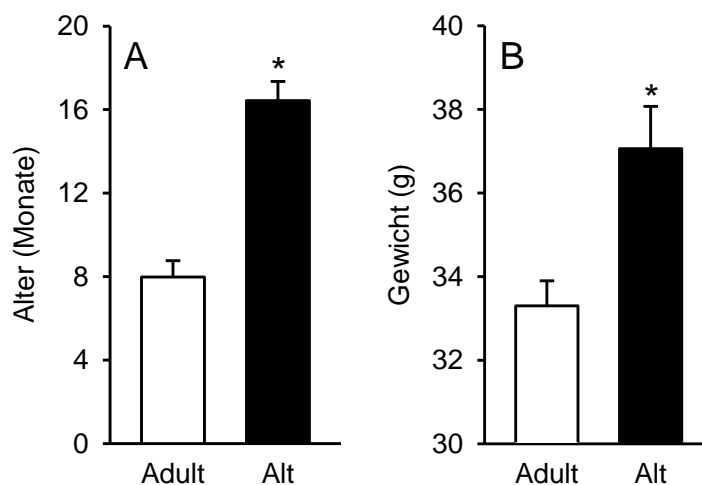
#### **5.2.1. Herstellung der Scaffolds**

Die in den Versuchen verwendeten nHA/PU-Scaffolds, welche für das Knochen-Tissue Engineering entwickelt wurden, stammten aus dem AO Research Institut in Davos, Schweiz. Die Scaffolds wurden mit der sogenannten Salz-Auswasch-Umkehr-Methode hergestellt [*Gorna und Gogolewski*, 2006; *Boissard et al.*, 2009]. Dabei werden Salzkristalle mit einer organischen Polymerlösung aus Hydroxylapatit-Nanopartikeln und Polyurethanen für 24 Stunden mechanisch vermengt. Anschließend wird der Lösung das Lösungsmittel entzogen, wodurch ein Gemisch aus festem Polymer und Salzkristallen entsteht. Im letzten Schritt muss lediglich das Salz aus den Poren der Scaffolds ausgewaschen werden. Die Porengröße kann durch die Menge und Größe der zuvor beigemischten Salzkristalle beeinflusst werden. In dieser Studie wurden Scaffolds mit einer  $90 \pm 2$  %-igen Porosität, einer

mittleren Porengröße von  $200 \pm 16 \mu\text{m}$  und einer mittleren Wandstärke von  $31 \pm 14 \mu\text{m}$  verwendet [Laschke *et al.*, 2010b]. Bevor die Scaffolds in die Rückenhautkammern implantiert werden konnten, wurden sie auf eine Größe von  $\sim 3 \times 3 \times 1 \text{ mm}$  zugeschnitten und steril verpackt.

### 5.2.2. Isolierung der Gefäßfragmente

Die Gefäßfragmente wurden aus dem epididymalen Fettgewebe von C57BL/6 Spendermäusen isoliert. Im ersten Studienabschnitt wurden Tiere mit einem durchschnittlichen Alter von 16 Monaten und einem Gewicht von  $> 34 \text{ g}$  als alte Spendermäuse verwendet. Die adulten Spendermäuse hatten ein Alter von 8 Monaten und ein Gewicht von  $< 34 \text{ g}$  (*Abbildung 1*). Im zweiten Studienabschnitt wurden ausschließlich Spendermäuse mit einem durchschnittlichen Alter von 8 Monaten und einem Gewicht von  $< 34 \text{ g}$  verwendet.



**Abbildung 1. (A, B)** Alter (Monate) (A) und Gewicht (g) (B) adulter (weiße Balken,  $n = 8$ ) und alter (schwarze Balken,  $n = 8$ ) C57BL/6 Spendermäuse zur Isolierung von Gefäßfragmenten aus epididymalem Fettgewebe in Studienabschnitt 1. Mittelwert  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs. adulte Spendermäuse.

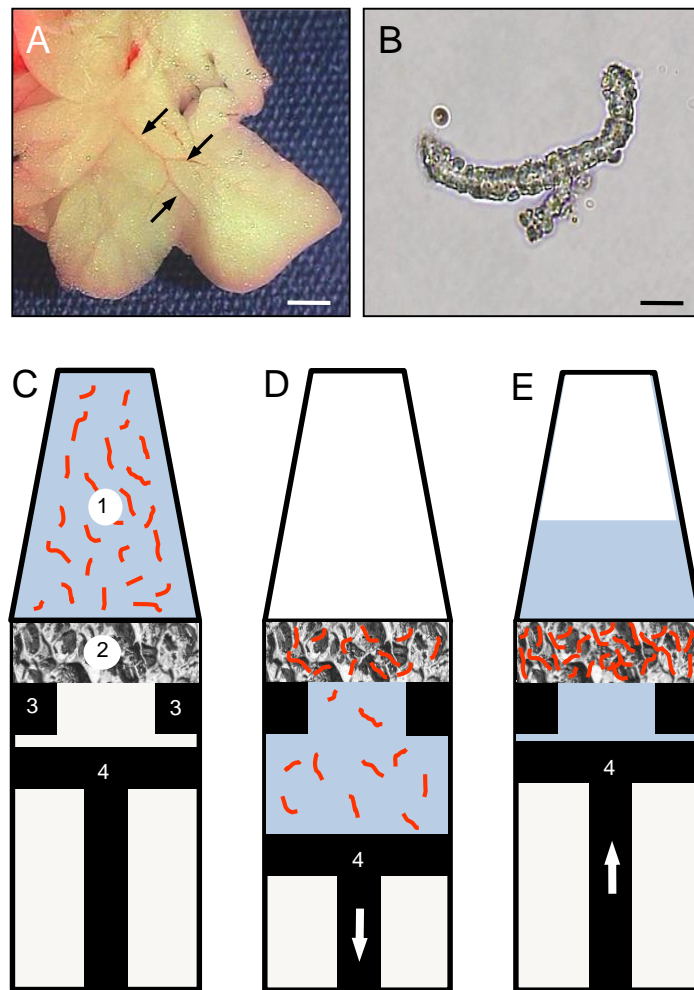
Die Spendermäuse wurden mittels intraperitonealer Injektion einer Narkoselösung bestehend aus Ketaminhydrochlorid (75 mg/kg Ketavet<sup>®</sup>; Pharmacia GmbH, Berlin, Deutschland) und Xylazinhydrochlorid (15 mg/kg Rompun<sup>®</sup>; Bayer, Leverkusen, Deutschland) anästhesiert. Anschließend wurde die Bauchhaut mit einem Rasierer

(Elektra II GH 204; Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) enthaart und mit einer Desinfektionslösung mit 70 %-igem Ethanol (Softasept® N; Braun, Melsungen, Deutschland) gereinigt. Über eine mediane Laparotomie wurde der Bauchraum der Spendermäuse eröffnet. Im nächsten Schritt wurden die epididymalen Fettpolster entnommen (*Abbildung 2A*), in Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und in eine Petrischale (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) mit 10 % Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM; 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin; PAA, Cölbe, Deutschland) transferiert. Zur Isolierung der Gefäßfragmente (*Abbildung 2 B*) wurden die Fettpolster erneut dreimal in PBS gewaschen und mit einer Mikroschere mechanisch zerkleinert. Anschließend wurde der Fettanteil durch enzymatische Digestion mit Kollagenase NB4G (0,5 U/ml; Serva, Heidelberg, Deutschland) unter starkem Rühren für 5 - 10 Minuten bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> von den Gefäßen abgetrennt. Die Kollagenase wurde daraufhin mit PBS + 20 % fötalem Kälber-Serum (FKS; PAA) neutralisiert und für 5 - 7 Minuten inkubiert, bevor der Fettüberstand entnommen werden konnte. Um zu gewährleisten, dass am Ende der Isolierung möglichst nur Gefäßfragmente in der Suspension zurückblieben, wurden die Inkubation und die Entnahme des Fettüberstandes mehrmals wiederholt. Nach milder Zentrifugation der Suspension für 10 Minuten bei 40 x g wurden die Gefäßfragmente, die sich am Boden des 1,5 ml Reaktionsgefäßes (Roth, Karlsruhe, Deutschland) abgesetzt hatten, in PBS + 20 % FKS resuspendiert, um deren Verklumpung zu verhindern. Die Anzahl der Gefäßfragmente, die aus einer Spendermaus isoliert wurden, konnte direkt nach der Isolierung mithilfe eines Leica Mikroskops mit Digitalkamera (Leica DM IL; Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) und einem computerassistierten Analysesystem (Leica Application Suite 4.8; Leica Microsystems) bestimmt werden.

### 5.2.3. Besiedlung der Scaffolds

Direkt nach der Isolierung wurden die Gefäßfragmente auf nHA/PU Scaffolds gesiedelt. Dazu wurden die Scaffolds mithilfe eines speziell angepassten Gummiring in 1 ml-Spritzen (BD Plastipak; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) fixiert. Deren Spitzen wurden mit einer Suspension aus 20 µl PBS und den isolierten Gefäßfragmenten befüllt. Anschließend wurde die Suspension durch Auf- und Abwärtsbewegung des Stempels durch die Scaffolds gesogen bzw. gepresst. Hierbei

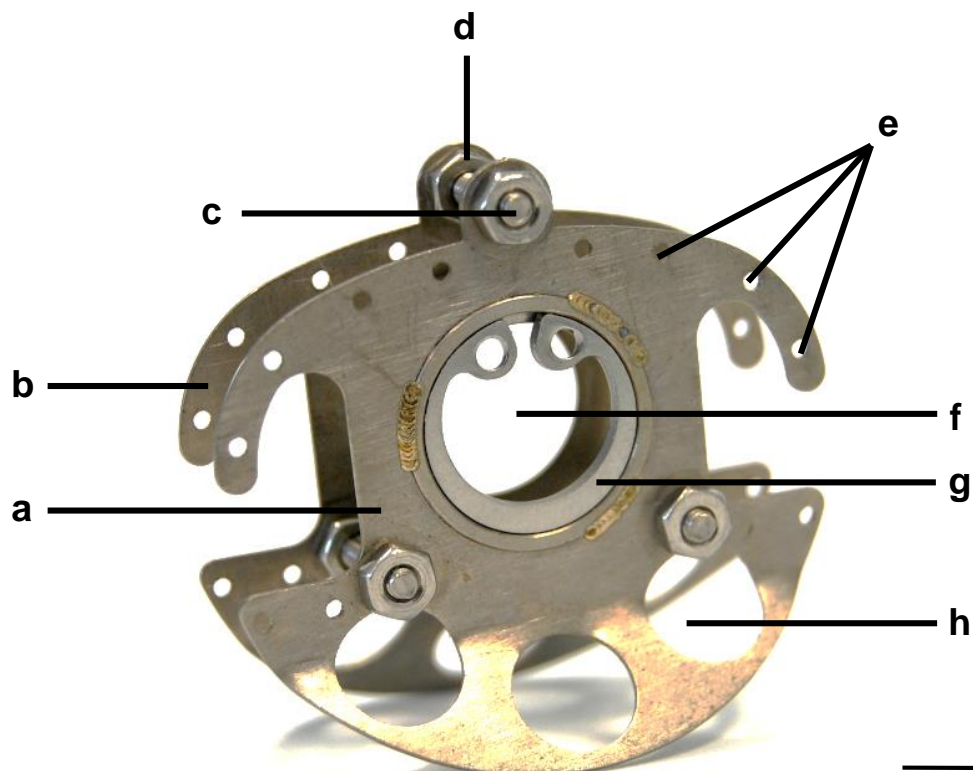
blieben die Gefäßfragmente in den Poren der Scaffolds hängen (*Abbildungen 2 C, D und E*). Die so prävascularisierten Scaffolds konnten danach aus den Spritzen entnommen werden und direkt in die Rückenhautkammern eingesetzt oder für histologische Analysen eingebettet werden. Zudem konnte durch die histologische Analyse frisch besiedelter Scaffolds die Verteilung der Gefäßfragmente innerhalb der Scaffolds analysiert werden.



**Abbildung 2.** (A) Lichtmikroskopische Aufnahme von isoliertem, epididymalem Fettgewebe aus einer 8-monate alten C57BL/6-Spendermaus mit darin verlaufenden Gefäßen (Pfeile). (Maßstab: 2 mm). (B) Phasen-contrastmikroskopische Aufnahme eines Gefäßfragments direkt nach der Isolierung. (Maßstab: 30  $\mu$ m). (C) Dynamisches Verfahren zur Besiedlung von nHA/PU-Scaffolds mit isolierten Gefäßfragmenten. Das Scaffold (2) wird hierzu mithilfe eines Gummirings (3) im Lumen einer modifizierten 1 ml Spritze fixiert. Die Spitze wurde mit einer Mischung aus Gefäßfragmenten und 20  $\mu$ l PBS befüllt (1) und der Stempel (4) wieder eingeführt. Durch das Abwärts- (D) und Aufwärtsbewegen (E) des Stempels (4) wird die Suspension durch das Scaffold gesogen und gepresst. Hierbei bleiben die Gefäßfragmente in den Poren des Scaffolds hängen.

### 5.3. Das Modell der Rückenhautkammer

Das 1993 etablierte Modell der Rückenhautkammer für Mäuse [Lehr et al., 1993] (Abbildung 3) wird häufig für in vivo Studien zur Untersuchung der Angiogenese genutzt. Mit diesem Modell ist die Beurteilung neugebildeter Gefäßnetzwerke innerhalb von Implantaten unter Berücksichtigung mikrozirkulatorischer Parameter über einen Zeitraum von 2 - 3 Wochen möglich. Durch die intravenöse Gabe von Fluoreszenzfarbstoffen können die Blutgefäße des frei präparierten Rückenhautmuskels oder perfundierte Gefäße innerhalb implantierter Scaffolds mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden. Die mikroskopischen Aufnahmen können anschließend mit einem speziellen Bildverarbeitungssystem quantitativ ausgewertet werden.



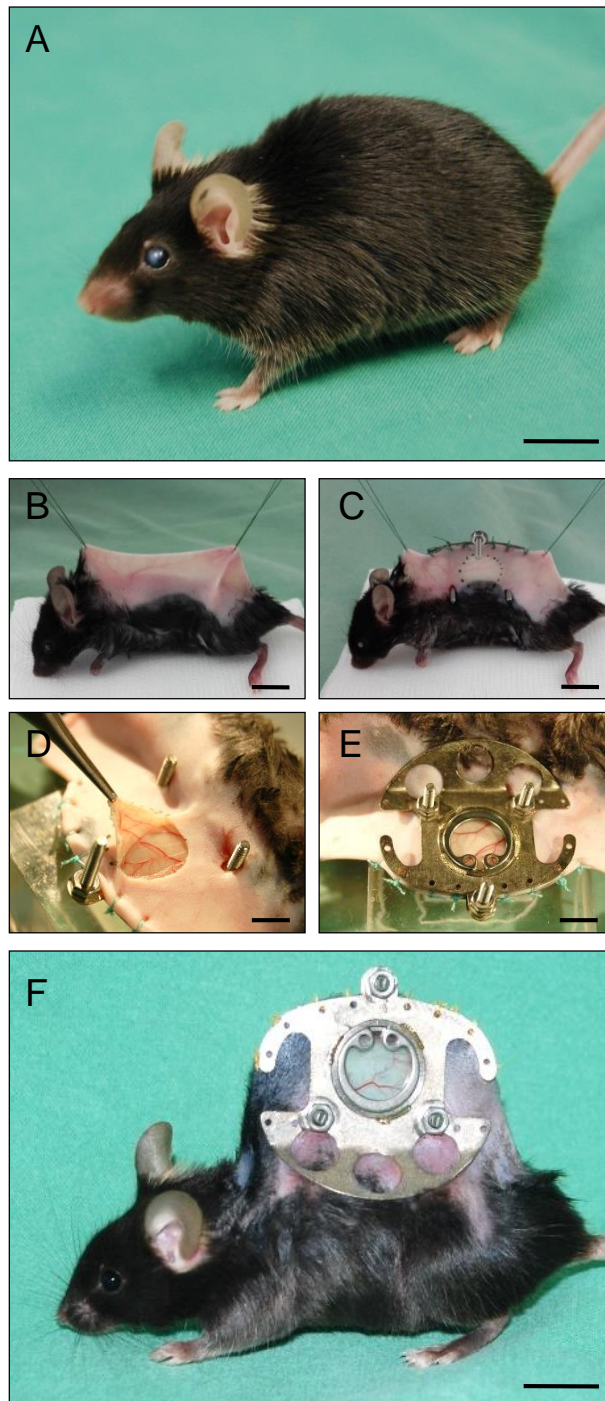
**Abbildung 3.** Perspektivische Ansicht einer Rückenhautkammer für die Maus. Diese besteht aus zwei symmetrisch zusammengesetzten Titanrahmen (Gewicht ~3 g). Vorderer Titanrahmen (a); hinterer Titanrahmen (a); Verbindungsschraube (c); Distanzschraubenmutter (d); Bohrungen für Fixationsfäden (e); Beobachtungsfenster mit Deckglas (f); Sprengring zur Fixierung des Deckglases (g). Ausbohrungen zur Gewichtsreduktion (h). Maßstab: 4,5 mm.

### 5.3.1. Implantation der Rückenhautkammer

Vor der Implantation der Rückenhautkammer (*Abbildung 3*) wurden die C57BL/6 Mäuse (*Abbildung 4 A*) mittels intraperitonealer Injektion der Narkoselösung anästhesiert. Danach wurden die Haare der Rückenhaut zunächst elektrisch mit einem Rasierer (Elektra II GH 204; Aesculap) und anschließend chemisch (Pilca med Creme; Asid Bonz, Böblingen, Deutschland) entfernt. Nach der Desinfektion der kahlen Rückenhaut mit 70 %-igem Ethanol (Softasept® N; Braun) erfolgte die Implantation der Rückenhautkammer.

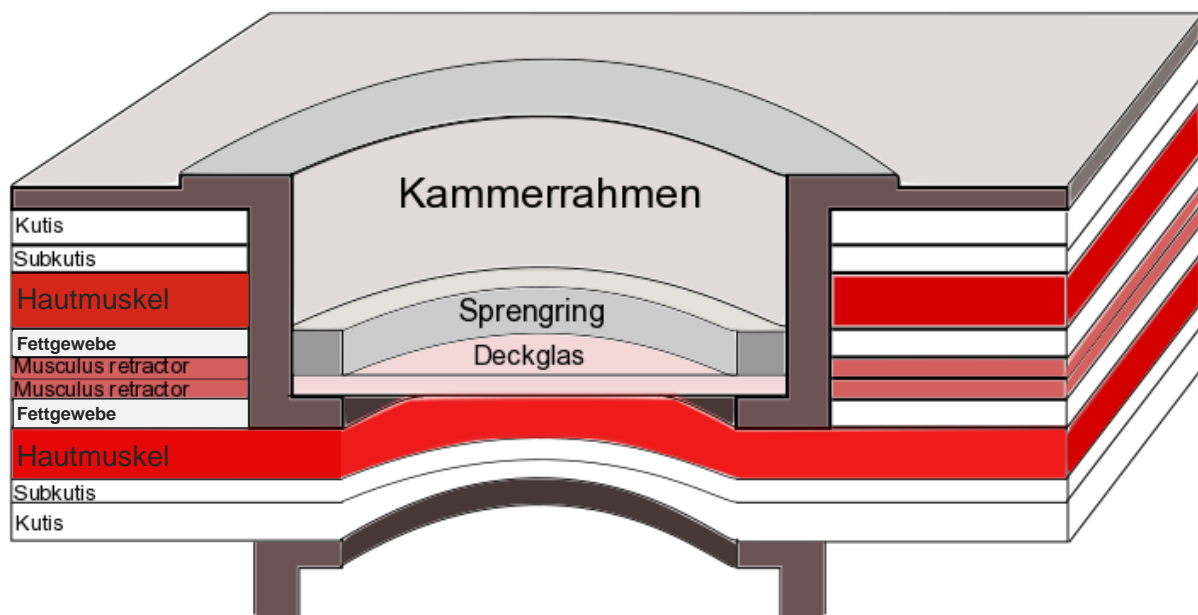
Zur Präparation der Rückenhautkammer wurden die Mäuse in Bauchlage positioniert und die elastische Rückenhaut entlang ihrer Mittellinie horizontal mit zwei Haltefäden aufgespannt (*Abbildung 4 B*). Unter Gegenlichtkontrolle konnte zunächst die Rückseite der aus zwei Titanrahmen zusammengesetzten Rückenhautkammer mit acht Nahtfäden an der aufgespannten Hautfalte fixiert werden. Durch zwei basale Inzisionen wurden die Verbindungsschrauben durch die Rückenhautfalte geführt und deren Position durch Klemmen gesichert. Hierdurch konnte das Zurückgleiten der Verbindungsschrauben verhindert und gleichzeitig das Präparationsfeld vorgespannt werden. Bevor die Versuchstiere zur mikrochirurgischen Präparation des Gewebes in Seitenlage positioniert wurden, erfolgte die Markierung des späteren Operationsfeldes unter Gegenlichtkontrolle. Hierzu musste der Durchmesser des markierten Bereichs etwas größer als der Durchmesser des Beobachtungsfensters der Rückenhautkammer gewählt werden (*Abbildung 4 C*). Dies verhinderte eine Kompression des Gewebes nach Anbringen des vorderen Kammerrahmens und stellte somit die physiologische Blutversorgung des Gewebes sicher. Mithilfe eines Stereo-Operationsmikroskops (Wild M650; Leica) wurden die dem Beobachtungsfenster zugewandte Kutis, Subkutis mit quergestreiftem Hautmuskel (M. panniculus carnosus) und beide Retraktormuskeln mit dem darunterliegenden Fettgewebe entfernt (*Abbildung 4 D*, *Abbildung 5*). Der so frei präparierte kontralaterale Hautmuskel wurde dann mit einer sterilen 0,9 % Natriumchloridlösung gespült. Anschließend konnte der vordere Titanrahmen deckungsgleich zum hinteren Teil der Rückenhautkammer über die Verbindungsschrauben positioniert und in einem Abstand von 400 - 500 µm mit Stahlmuttern verschraubt werden. Im letzten Schritt wurde das freiliegende Gewebe im Bereich des Beobachtungsfensters mit einem





**Abbildung 4.** (A) C57BL/6 Maus. Maßstab: 11 mm. (B-E) Schrittweise Präparation der Rückenhautkammer. Anbringen der Haltefäden (B). Maßstab: 12 mm. Fixation des hinteren Anteils der Rückenhautkammer (C). Maßstab: 12 mm. Mikroskopische Präparation des Gewebes der Rückenhautkammer (D). Maßstab: 5,7 mm. Anbringen des vorderen Anteils der Rückenhautkammer und Sicherung des Deckglases mit einem Sprengring (E). Maßstab: 6,5 mm. (F) C57BL/6 Maus zwei Tage nach Präparation der Rückenhautkammer. Maßstab: 11 mm.

Deckglas luftdicht verschlossen und mit einem Sprengring gesichert (*Abbildung 4 E*). Vor der Durchführung der Experimente konnten sich die Versuchstiere für mindestens 48 Stunden von der Narkose und dem chirurgischen Trauma der Operation erholen (*Abbildung 4 F*). Im Anschluss daran war ein direkter Zugang zu dem Beobachtungsfeld jederzeit durch das Entfernen des Sprenglings und des Deckglases möglich.



**Abbildung 5.** Schematische Darstellung eines Querschnitts durch die Rückenhautkammer.

### 5.3.2. Implantation von Scaffolds in die Rückenhautkammer

Zur Implantation der Scaffolds in die Rückenhautkammer wurden die Versuchstiere erneut narkotisiert und auf einer speziell angefertigten Plexiglasbühne fixiert. Nachdem der Sprengring und das Deckglas entfernt wurden, konnten die Scaffolds zentral im Beobachtungsfenster auf dem freiliegenden Gewebe platziert werden. Anschließend wurde das Beobachtungsfenster erneut unter Vermeidung von Luft-einschlüssen mit einem Deckglas und einem Sprengring verschlossen.

### **5.3.3. Applikation von MALP-2 in die Rückenhautkammer**

Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die lokale Applikation von MALP-2 (MALP-2 Research, Braunschweig, Deutschland) auf das freiliegende Kammergewebe die Vaskularisierung der implantierten Scaffolds verbessert.

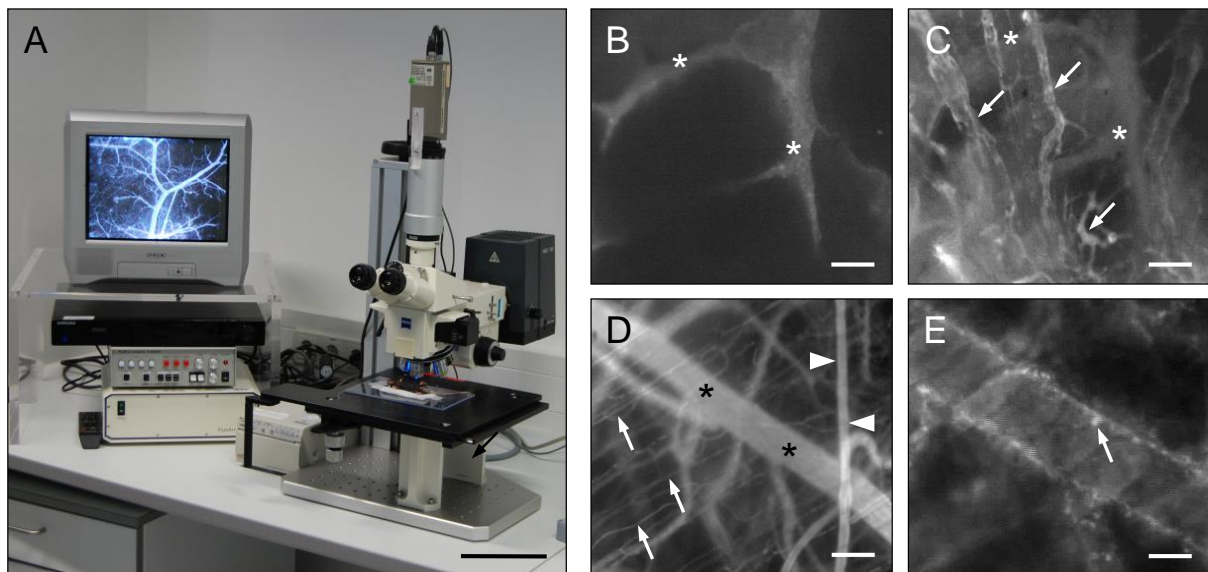
MALP-2 wurde als Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml in 30 % Isopropanol bei -20°C aufbewahrt und vor der Applikation mit 0,9 % Natriumchloridlösung auf 0,5 µg MALP-2 in 150 µl Vehikel (3,3 µg/ml) verdünnt [Laschke *et al.*, 2014a; Grässer *et al.*, 2016]. Zur Applikation von MALP-2 in die Rückenhautkammer wurde das Deckglas 30 Minuten vor der Implantation der Scaffolds geöffnet und einmal mit einer 0,9 % Natriumchloridlösung vorgespült. Anschließend erfolgte die lokale Applikation von 150 µl MALP-2 (0,5 µg) oder 150 µl Vehikel (PBS) auf das freiliegende Kammergewebe. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit wurden die Scaffolds implantiert und die Rückenhautkammer verschlossen.

## **5.4. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie**

### **5.4.1. Durchführung der intravitale Fluoreszenzmikroskopie**

Die Vaskularisierung der implantierten Scaffolds und die leukozytäre Entzündungsreaktion in den Venolen der Rückenhautkammer wurden mithilfe der intravitale Fluoreszenzmikroskopie über einen Zeitraum von 14 Tagen untersucht. Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurde mit einem modifizierten Zeiss Axiotech Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt (*Abbildung 6 A*). Das Mikroskop war mit einer 100 Watt Quecksilber (HBO)-Dampflampe und einem zwischengeschalteten Filterblock ausgestattet. Dies ermöglichte eine Anregung mit Licht der Wellenlänge von 330 - 390 nm, 450 - 490 nm und 530 - 560 nm. Die mikroskopischen Bilder wurden mit einer CCD (charge coupled-device)-Videokamera (FK6990; Pieper, Schwerte, Deutschland) auf einen 14-Zoll Monitor (Trinitron; Sony, Tokyo, Japan) übertragen und auf DVDs für die spätere Auswertung gespeichert. Mit 5x, 10x und 20x Objektiven mit langem Arbeitsabstand (Zeiss) konnten Vergrößerungen von x115, x230 und x460 auf dem Monitor erzielt werden. Vor dem

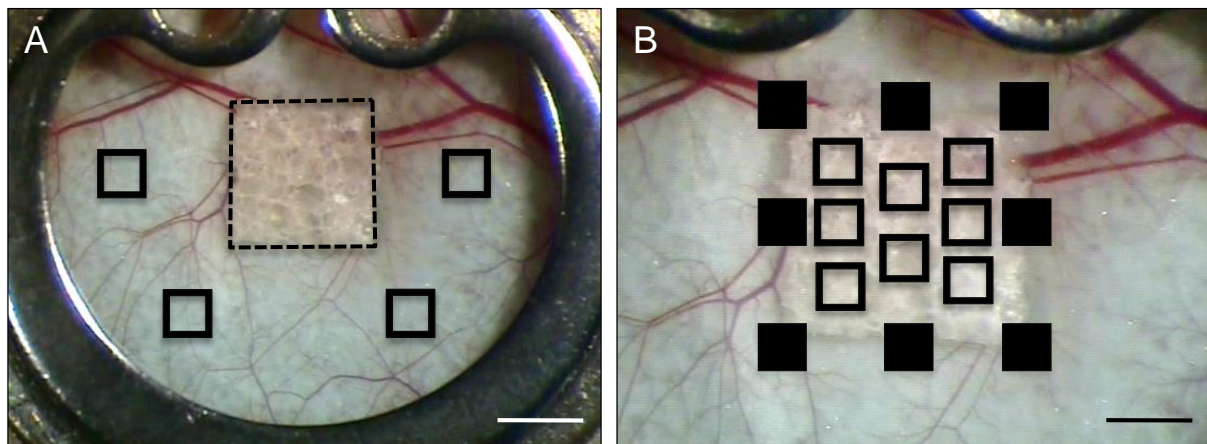
Beginn der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie wurden die Mäuse durch eine intraperitoneale Injektion von Ketaminhydrochlorid (75 mg/kg Ketavet®; Pharmacia GmbH) und Xylazinhydrochlorid (15 mg/kg Rompun®; Bayer) narkotisiert. Anschließend erfolgte die intravenöse retrobulbäre Gabe von 0,05 ml des Plasma-markers 5 % Fluoreszein-Isotiozyanat (FITC)-markiertes Dextran (Molekulargewicht: 150.000 Da; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) zur Darstellung perfundierter Blutgefäße innerhalb der Scaffolds (*Abbildung 6 B und C*) und der Mikrozirkulation des Kammergewebes (*Abbildung 6 D*) [Debergh et al., 2015]. Zur Darstellung der Leukozyten (*Abbildung 6 E*) in den Venolen der Blutgefäße wurden 0,05 ml 0,1 % Rhodamin 6G (Sigma-Aldrich) ebenfalls intravenös retrobulbär injiziert [Baatz et al., 1995; Herr et al., 2015]. Darauffolgend wurden die narkotisierten Versuchstiere auf einer speziellen Plexiglasplatte in Seitenlage fixiert. Dadurch konnte das Beobachtungsfenster der Rückenhautkammer horizontal unter dem Mikroskop positioniert werden.



**Abbildung 6.** (A) Mikroskop zur intravitalen fluoreszenzmikroskopischen Darstellung des Gewebes der Rückenhautkammer (rechts) mit Bildschirm und Aufnahmeeinheit (links) Maßstab: 170 mm. (B, C) nHA/PU-Scaffold (B, C, Sternchen) an Tag 0 (B) und Tag 14 (C) nach Implantation in die Rücken-hautkammer mit neu gebildeten Blutgefäßen an Tag 14 (C, Pfeile). Maßstab: 60  $\mu$ m. (D) Mikro-zirkulation innerhalb des Gewebes der Rückenhautkammer mit Arteriolen (Pfeilspitzen), Kapillaren (Pfeile) und Venolen (Sternchen). Maßstab: 76  $\mu$ m. (E) Venole der Rückenhautkammer mit einem adhären Leukozyten (Pfeil) an der Gefäßwand. Maßstab: 44  $\mu$ m.

### 5.4.2. Mikrozirkulatorische Parameter

Um die Vaskularisierung der Scaffolds im zeitlichen Verlauf analysieren zu können, wurden intravitale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen an den Tagen 0, 3, 6, 10 und 14 nach Implantation der Scaffolds in die Rückenhautkammern gemacht und mithilfe des computerassistierten Bildverarbeitungssystems CapImage (Version 6.02; Dr. Zeintl, Ingenieurbüro, Heidelberg, Deutschland) ausgewertet. Im ersten Studienabschnitt wurde die Anzahl der perfundierten "regions of interest" (ROIs) und die funktionelle Kapillardichte in 8 Feldern im Inneren der Scaffolds und in 8 Feldern im Randbereich des Scaffolds (*Abbildung 7 B*) mit einer Vergrößerung von x460 bestimmt. Im zweiten Studienabschnitt wurde lediglich die Anzahl der perfundierten ROIs und die funktionelle Kapillardichte in 8 Feldern im Inneren der Scaffolds mit einer Vergrößerung von x460 bestimmt.



**Abbildung 7. (A, B)** Stereomikroskopische Aufnahmen eines nHA/PU-Scaffolds (A, unterbrochene Linie) nach Implantation in die Rückenhautkammer. Zur intravitalen fluoreszenzmikroskopischen Beurteilung der Mikrozirkulation und Entzündungsreaktion in der Rückenhautkammer wurden jeweils 4 ROIs ausgewertet (A, schwarze Quadrate). Maßstab: 1,8 mm. Die Vaskularisierung der Scaffolds wurde in 8 ROIs im Randbereich (B, gefüllte Quadrate) und in 8 ROIs im Zentrum (B, leere Quadrate) der Scaffolds analysiert. Maßstab: 1 mm.

Dabei wurde die Position der ROIs in den Scaffolds an allen Versuchstagen und in allen Versuchstieren beibehalten, um eine Vergleichbarkeit der Messergebnisse zu gewährleisten. Als perfundierte ROIs wurden Felder definiert, die mindestens ein neues, perfundiertes Blutgefäß aufwiesen. Die perfundierten ROIs wurden dann als



prozentualer Anteil aller ausgewerteten ROIs angegeben. Die funktionelle Kapillardichte wurde bestimmt, indem alle zu diesem Zeitpunkt perfundierten Blutgefäße auf einem Computerbildschirm mit der Maus nachgezogen wurden. Anhand von CapImage konnte dann ihre Gesamtlänge sowie ihre Dichte pro Beobachtungsfeld (Gefäßlänge/Gefäßfläche; cm/cm<sup>2</sup>) ermittelt werden.

### **5.4.3. Mikrohämodynamik der perfundierten Gefäße**

Mit den perfundierten ROIs und der funktionellen Kapillardichte konnten die Dichte und die Ausdehnung der neugebildeten Gefäßnetzwerke innerhalb der Implantate quantitativ beurteilt werden. Um noch detailliertere Aussagen über die neugebildeten Gefäßnetzwerke treffen zu können, wurden zusätzliche mikrohämodynamische Parameter wie der Durchmesser, die Blutzellgeschwindigkeit und die Scherrate einzelner Gefäße gemessen.

#### **5.4.3.1. Gefäßdurchmesser**

Zur Messung des Durchmessers eines Gefäßes wurden zwei senkrecht zum Gefäß liegende Randpunkte auf der Gefäßwand miteinander verbunden. Die Länge der Verbindungsstrecke wurde anschließend mit der Computersoftware berechnet und in µm angegeben. Abhängig vom Untersuchungstag und von der Anzahl der bereits perfundierten Gefäße im Inneren der Scaffolds wurde die Messung an jeweils mindestens 10 - 20 Gefäßen vorgenommen. Zur Standardisierung der Untersuchung wurde eine horizontale Mittellinie in das jeweilige Beobachtungsfeld gelegt und nur diejenigen Gefäße ausgewertet, die diese Linie senkrecht kreuzten.

#### **5.4.3.2. Blutzellgeschwindigkeit**

Die Blutzellgeschwindigkeit in den einzelnen Gefäßen konnte mit der computer-assistierten Line-Shift-Diagramm-Methode bestimmt werden [Klyscz *et al.*, 1997]. Die Messung der Blutzellgeschwindigkeit wurde dabei an denselben Gefäßen durchgeführt, an denen zuvor die Messung des Gefäßdurchmessers erfolgte. Hierzu wurde an einem Standbild eine Messlinie in die Mitte des Gefäßlumens gelegt, die parallel zu der Gefäßwand und entlang der Flussrichtung des Blutes ausgerichtet

war. Anschließend wurde die DVD für 10 Sekunden abgespielt. In dieser Zeit wurde für jedes Halbbild entlang der eingezeichneten Messlinie ein Grauwertprofil erstellt und in einem separaten Bildspeicher aufgezeichnet. Aus den so erstellten aneinandergereihten Grauwertprofilen konnte der Computer ein individuelles Line-Shift-Diagramm erstellen. Durch das abwechselnde Auftreten von Erythrozyten und Blutplasma entlang der Mittellinie des Blutflusses waren in dem Diagramm parallel verlaufende helle und dunkle Linien zu erkennen. Aus der Steigung dieser Linien wurde die Blutzellgeschwindigkeit in  $\mu\text{m/s}$  errechnet.

#### 5.4.3.4. Scherrate

Die Scherrate ist ein Maß für die Scherkräfte, die auf die Zellen innerhalb eines Blutgefäßes einwirken. Die Scherrate  $\gamma$  basiert auf der Newton'schen Definition [Kremer et al., 2008]:

$$\gamma = 8 * \frac{v}{d} \quad [1/\text{sec}]$$

wobei  $v$  für die Blutzellgeschwindigkeit und  $d$  für den Gefäßdurchmesser steht.

#### 5.4.4. Leukozytäre Entzündungsreaktion

Zur intravitalmikroskopischen Detektion wurden die Leukozyten durch die intravenöse Gabe des Fluoreszenzmarkers Rhodamin 6G in vivo angefärbt. So konnte die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion nach Applikation von MALP-2 oder Vehikel in einer Vergrößerung von x460 in jeweils vier Venolen des Kammergewebes sowohl qualitativ als auch quantitativ beurteilt werden (*Abbildung 7 A*). Hierbei ließen sich i) frei fließende Leukozyten, ii) rollende Leukozyten, deren Fließgeschwindigkeit durch Margination und kurzzeitigen Endothelzellkontakt reduziert war, und iii) adhärente Leukozyten, die dem Gefäßendothel über eine definierte Beobachtungszeit von 20 Sekunden fest anhafteten, unterscheiden. Die Anzahl der rollenden Leukozyten, die eine definierte, senkrecht zum Gefäß verlaufende Linie, innerhalb von einer Minute passierten, wurden in  $\text{n/min}^{-1}$  und die adhärenenten Leukozyten, die über einer definierten Strecke an der Endotheloberfläche des jeweiligen Blutgefäßes adhärten, wurden in  $\text{n/mm}^{-2}$  angegeben [Hoffmann et al., 2004].

## **5.5. Histologie und Immunhistochemie**

### **5.5.1. Histologie**

Im Anschluss an die letzte intravitalmikroskopische Untersuchung an Tag 14 wurden die Versuchstiere mit einer Überdosis Anästhetikum eingeschläfert. Das Gewebe der Rückenhautkammer wurde dann für weitere histologische und immunhistochemische Untersuchungen entnommen und in 4 %-iger Formalinlösung (Roth) bei 20°C für 24 Stunden fixiert. Danach wurden 3-µm dicke Serienschnitte für weitere Untersuchungen angefertigt. Mittels Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung nach Standardprotokoll konnte das neugebildete Granulationsgewebe im Inneren und im Randbereich der Scaffolds beurteilt werden.

### **5.5.2. Immunhistochemie**

Die immunhistochemische Färbung der entnommenen Präparate erfolgte bei allen Schnitten nach einem Standardprotokoll. Hierzu wurden die 3 µm dicken Paraffinschnitte in reinem Xylol entparaffiniert und für 17 Stunden in 200 ml Citraconpuffer (pH 7,4) bei 60°C im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit Aqua destillata gespült und mit 3 % Wasserstoffperoxid für 10 Minuten inkubiert, wodurch die endogenen Peroxidasen blockiert wurden. Nach einer weiteren Spülung mit Aqua destillata und PBS wurden die Präparate für weitere 30 Minuten in 1 ml PBS + 30 µl Ziege-Normalserum (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Im nächsten Schritt konnten die primären und dann die sekundären Antikörper (Ak) appliziert werden.

Als primäre Ak dienten ein monoklonaler Ratten-anti-Maus-Ak gegen CD31 (1:30; Dianova), ein polyklonaler Kaninchen-anti-Human-Ak gegen SMA (1:100, α-SMA; Abcam, Cambridge, UK), ein monoklonaler Maus-anti-Maus-Ak gegen proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (1:100, PCNA; Dako, Hamburg, Deutschland), ein polyklonaler Kaninchen-anti-Maus-Ak gegen cleaved caspase-3 (Casp-3) (1:100, Casp-3; New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) und ein polyklonaler Kaninchen-anti-Maus-Ak gegen MMP-9 (1:25, MMP-9; Abcam).



Als sekundäre Ak dienten ein Ziege-anti-Ratte-IgG-Cy3-Ak (1:50; Dianova GmbH), ein Ziege-anti-Ratte-IgG-Alexa488-Ak (1:50; Invitrogen, Eugene, OR, USA), ein Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Cy3-Ak (1:200, Dianova GmbH), ein Biotin-markierter-IgG-Ziege-anti-Maus-Ak (1:200; Dianova GmbH) und ein Biotin-markierter-IgG Ziege-anti-Kaninchen-Ak (ready-to-use; Abcam).

Zur Detektion der Biotin-markierten-Ak wurde Cy3-markiertes-Streptavidin (1:20; Invitrogen) verwendet. In jedem histologischen Schnitt wurden zusätzlich die Kerne mit Hoechst 33342 (1:500; Sigma-Aldrich) angefärbt. Die Auswertung der Schnitte erfolgte mit einem BX60 Mikroskopsystem von Olympus (Hamburg, Deutschland). Die Gefäßdichte im Zentrum und im Randbereich der implantierten Scaffolds wurde mittels Detektion von CD31<sup>+</sup> Zellen (mm<sup>-2</sup>) quantifiziert. Durch das Auszählen von PCNA<sup>+</sup> bzw. Casp-3<sup>+</sup> Endothelzellen wurde die Anzahl proliferierender bzw. apoptotischer Zellen innerhalb kultivierter Scaffolds bestimmt. Im ersten Studienabschnitt wurde in isolierten Gefäßfragmenten zusätzlich der Anteil von MMP-9<sup>+</sup> perivaskulären Zellen ermittelt. Im zweiten Studienabschnitt wurden isolierte Gefäßfragmente für 24 Stunden in endothelial cell growth medium MV (EC Medium) (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) mit Vehikel oder MALP-2 (0,5 µg) inkubiert und danach der prozentuale Anteil von Casp-3<sup>+</sup> Endothelzellen und perivaskulären Zellen bestimmt.

### **5.5.3. In vitro Analyse der mikrovaskulären Fragmente**

#### **5.5.3.1. Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)**

In einer früheren Studie konnte bereits gezeigt werden, dass isolierte Gefäßfragmente Wachstumsfaktoren wie VEGF oder bFGF freisetzen [Laschke *et al.*, 2012b]. Um zu überprüfen, ob die Menge an freigesetzten Wachstumsfaktoren aus isolierten Gefäßfragmenten abhängig vom Alter des Fettgewebsspenders ist, wurden aus jeweils 4 adulten und 4 alten Spendermäusen Gefäßfragmente isoliert und auf 8 Scaffolds (n = 4 pro Gruppe) gesiedelt. Jedes Scaffold wurde dann in eine mit 550 µl EC Medium (PromoCell) befüllte 48-Well Platte (Greiner Bio-one GmbH, Melsungen, Deutschland) transferiert. Um die hypoxischen Verhältnisse in der Rückenhautkammer zu simulieren, wurden die Scaffolds anschließend in einer Hypoxiekammer bei konstanter Gasmischung (95 % N<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) und einer Temperatur von 37°C für

18 Stunden kultiviert. Im Kulturmedium wurde so eine Sauerstoffsättigung von < 5 mmHg erzeugt. Dies entspricht einer atmosphärischen Sauerstoffkonzentration von 0,5 % [Oberringer *et al.*, 2005; Purins *et al.*, 2010]. Nach der Kultivierung wurden aus jedem Well 100 µl des Überstandes entnommen und mittels ELISA VEGF und bFGF analysiert, wobei jede Probe doppelt bestimmt wurde. Die erhaltenen Werte wurden gegenüber Kontrollwerten aus Messungen in reinem Kulturmedium ohne Gefäßfragmente korrigiert. Unter Verwendung rekombinanter muriner VEGF und bFGF Ak als Standard erfolgte die Bestimmung der Menge des aus den kultivierten Scaffolds in das Medium freigesetzten VEGF und bFGF mittels ELISA-Kit (VEGF: R&D Systems Europe, Abingdon, UK; bFGF: RayBiotech, Norcross, GA, USA).

#### **5.5.3.2. Durchflusszytometrische Analyse**

Isolierte Gefäßfragmente enthalten unter anderem auch MSCs und EPCs [Laschke *et al.*, 2012b]. Um zu untersuchen, ob der Stammzellgehalt in den isolierten Gefäßfragmenten abhängig vom Alter der Spendermäuse ist, wurden aus 10 adulten und 12 alten Spendermäusen Gefäßfragmente isoliert. Die Gefäßfragmente wurden dann für 30 Minuten in Accutase<sup>®</sup> (BioLegend, Fell, Deutschland) zu Einzelzellen digestiert. Die erste Hälfte der Zellen wurde auf die Expression der MSC-Marker CD117-FITC (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) und unmarkiertes Ratte-anti-Maus CD73 (BD Pharmingen) und die andere Hälfte der Zellen auf die EPC-Marker-Kombination Sca-1-FITC (BD Pharmingen) und VEGFR-2-PE (BD Pharmingen) untersucht. Als Kontrolle dienten Isotyp-identische Ratten IgG2a $\kappa$  oder IgG2b $\kappa$  (BD Pharmingen) und Ziege-anti-Ratte IgG-Cy3 (Dianova GmbH). Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse mithilfe eines FACScan (BD Pharmingen). Die erhobenen Daten wurden mit dem Software-Paket CellQuest (BD Pharmingen) ausgewertet.

### **5.6. Experimentelles Protokoll**

Um die Anzahl der Gefäßfragmente zu bestimmen, die pro Isolierung gewonnen werden konnten, wurden Gefäßfragmente aus zwei Spendermäusen isoliert und lichtmikroskopisch quantifiziert. Zusätzlich wurde die Qualität der Besiedlungstechnik

der Scaffolds unter Verwendung isolierter Gefäßfragmente aus zwei weiteren Spendermäusen histologisch untersucht und dokumentiert (*Abbildung 8*).

Für in vivo Versuche wurden Gefäßfragmente aus 30 C57BL/6 Spendermäusen (Studienabschnitt 1: alt, n=8; adult, n=8 und Studienabschnitt 2: adult, n=14) isoliert und auf 30 Scaffolds gesiedelt. Diese wurden im ersten Studienabschnitt direkt und im zweiten Studienabschnitt nach lokaler Applikation von MALP-2 oder Vehikel in die Rückenhautkammern von 30 3 - 4 Monate alten C57BL/6 Mäusen implantiert.

Die Präparation der Rückenhautkammer erfolgte 48 Stunden vor der Implantation der Scaffolds. Somit hatten die Versuchstiere ausreichend Zeit, sich von dem chirurgischen Eingriff und der Narkose zu erholen. Direkt nach der Implantation sowie an den Tagen 3, 6, 10 und 14 wurde die Vaskularisierung der Scaffolds analysiert. Nach der Applikation von MALP-2 bzw. Vehikel wurde zusätzlich die leukozytäre Entzündungsreaktion in der Rückenhautkammer untersucht. Nach Abschluss der letzten intravitalen Fluoreszenzmikroskopie an Tag 14 wurden die Versuchstiere durch eine Überdosis des Narkosemittels eingeschläfert und das Kammergewebe für histologische und immunhistochemische Analysen entnommen.

Für zusätzliche in vitro Versuche wurden im ersten Studienabschnitt Gefäßfragmente aus 38 Spendermäusen isoliert und für Untersuchungen mittels ELISA (adult, n=4; alt, n=4), für durchflusszytometrische Untersuchungen (adult, n=10; alt, n=12) und für immunhistochemische Untersuchungen (adult, n=4, alt n=4) verwendet. Im zweiten Studienabschnitt wurden zudem Gefäßfragmente aus 6 adulten Spendermäusen für immunhistochemische Untersuchungen entnommen.

## 5.7. Versuchsgruppen

In der vorliegenden Arbeit wurden vier Versuchsgruppen, die sich auf zwei Studienabschnitte verteilen, analysiert:

**Studienabschnitt 1:** Vaskularisierung implantierter Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus adulten und alten Spendermäusen.

Gruppe 1 (Kontrolle): Gefäßfragmente aus 8 adulten C57BL/6-Spendermäusen wurden auf 8 Scaffolds gesiedelt und in die Rückenhautkammern von 8 C57BL/6-Mäusen implantiert.

Gruppe 2:	Gefäßfragmente aus 8 alten C57BL/6-Spendermäusen wurden auf 8 Scaffolds gesiedelt und in die Rückenhautkammern von 8 C57BL/6-Mäusen implantiert.
<b>Studienabschnitt 2:</b>	Vaskularisierung implantierter Scaffolds nach lokaler Applikation von MALP-2 oder Vehikel
Gruppe 1 (Kontrolle):	Gefäßfragmente aus 7 C57BL/6-Spendermäusen wurden auf 7 Scaffolds gesiedelt. 30 Minuten vor Implantation der Scaffolds in die Rückenhautkammern von 7 C57BL/6-Mäusen erfolgte die lokale Applikation von Vehikel auf das freiliegende Kammergewebe.
Gruppe 2:	Gefäßfragmente aus 7 C57BL/6-Spendermäusen wurden auf 7 Scaffolds gesiedelt. 30 Minuten vor Implantation der Scaffolds in die Rückenhautkammern von 7 C57BL/6-Mäusen erfolgte die lokale Applikation von MALP-2 auf das freiliegende Kammergewebe.

## 5.8. Statistik

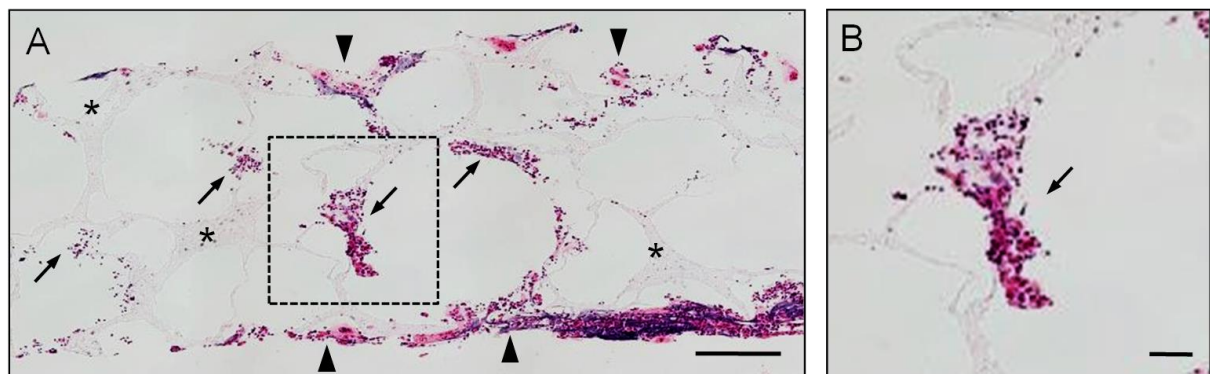
Alle Daten wurden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts ( $MW \pm SEM$ ) angegeben. Nachdem die Daten auf Normalverteilung und vergleichbare Varianz geprüft wurden, erfolgte die Analyse der Unterschiede zwischen zwei Gruppen mit dem ungepaarten Student's t-Test. Mittels analysis of variance (ANOVA) für wiederholte Messungen erfolgte der Vergleich der einzelnen Untersuchungstage innerhalb der einzelnen Gruppen. Zur Detektion bestimmter Unterschiede zwischen den einzelnen Tagen erfolgte anschließend der Student-Newman-Keuls Test unter Korrektur des  $\alpha$ -Fehlers nach Bonferroni für wiederholte Messungen. Die statistische Analyse der Daten wurde mit dem Softwarepaket SigmaStat (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) durchgeführt. Werte mit  $p < 0,05$  wurden als signifikant angesehen.

## 6. Ergebnisse

### 6.1. Vaskularisierung implantierter Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus adulten und alten Spendermäusen

#### 6.1.1. Isolierung der Gefäßfragmente und Besiedlung der Scaffolds

Die Anzahl der Gefäßfragmente, die aus dem epididymalen Fettgewebe einer Spendermaus isoliert werden konnten, wurde mittels eines Leica Mikroskops mit Digitalkamera und computerassistiertem Analysesystem direkt nach der Isolierung bestimmt. Die Auswertung ergab, dass pro Fettgewebsspender  $16.165 \pm 545$  Gefäßfragmente isoliert werden konnten. Dies entspricht auch der Anzahl der Gefäßfragmente, die auf jedes einzelne Scaffold gesiedelt wurden. Die zusätzliche histologische Analyse der frisch besiedelten Scaffolds zeigte, dass die verwendete Besiedlungstechnik zu einer gleichmäßigen Verteilung der isolierten Gefäßfragmente über das gesamte Scaffold führte (*Abbildung 8*).

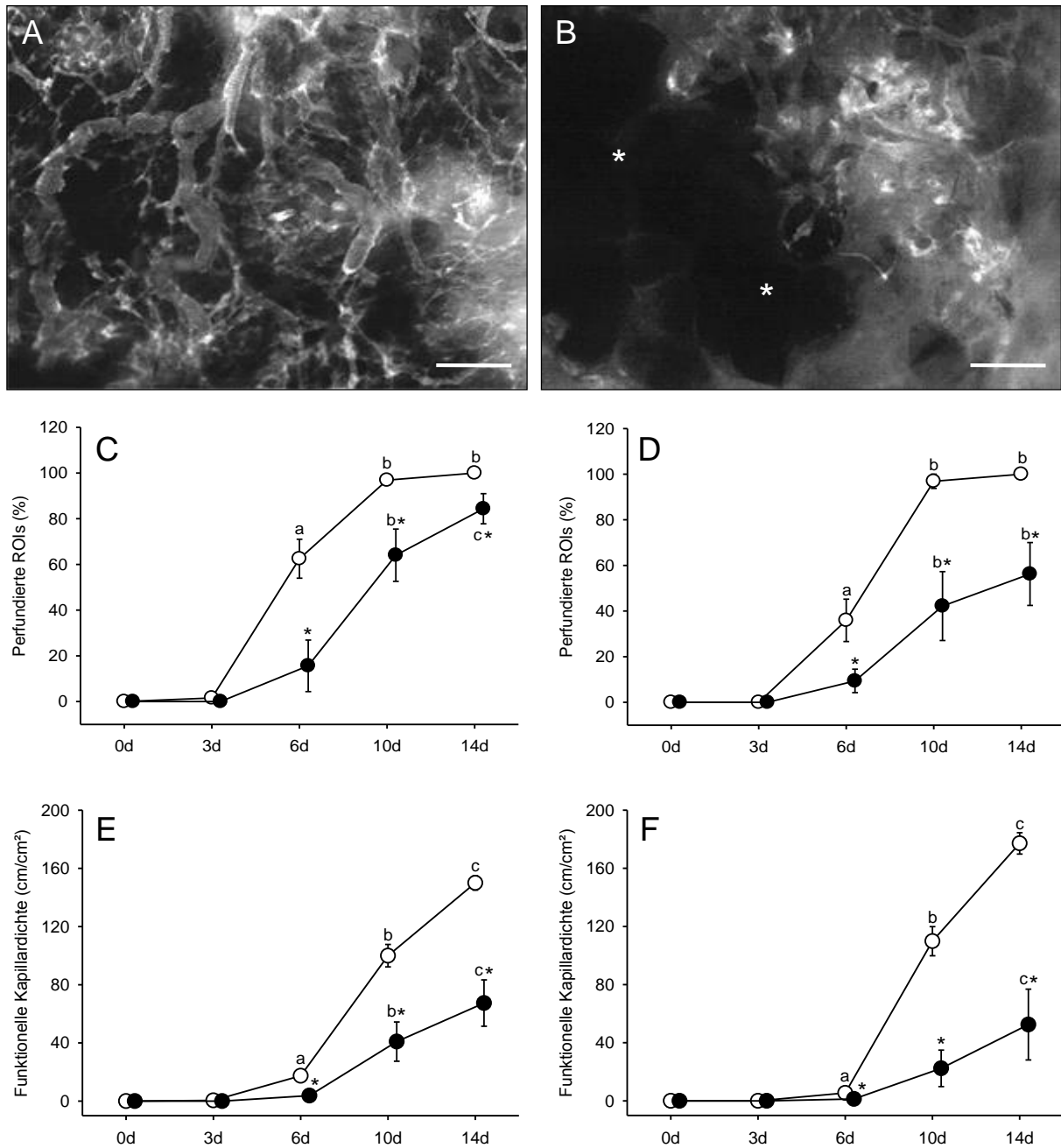


**Abbildung 8.** (A) HE-Schnitt eines nHA/PU-Scaffolds (Sternchen) direkt nach der Besiedlung mit Gefäßfragmenten. Die Gefäßfragmente sind sowohl im Randbereich des Scaffolds (Pfeilspitzen) als auch im Zentrum des Scaffolds (Pfeile) gleichmäßig verteilt. Maßstab: 200  $\mu\text{m}$ . (B) Vergrößerung des gestrichelten Rechtecks in A mit einem Gefäßfragment (Pfeil). Maßstab: 41  $\mu\text{m}$ .

### 6.1.2. Vaskularisierung implantierter Scaffolds

In diesem Studienabschnitt wurde die Vaskularisierung von Scaffolds nach der Besiedlung mit Gefäßfragmenten aus adulten und alten Spendermäusen untersucht. Die Vaskularisierung der implantierten Scaffolds wurde mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie über einen Zeitraum von 14 Tagen in vivo analysiert (*Abbildung 9 A-F*). Als Zeichen einer frühen angiogenen Reaktion des Empfänger-gewebes waren bereits nach drei Tagen perfundierte ROIs im Randbereich der Scaffolds nachweisbar. Die perfundierten Gefäße hatten ihren Ursprung im Gefäßsystem des Empfängergewebes und wuchsen von außen in die Scaffolds ein. In einer früheren Studie konnte durch die Besiedlung der Scaffolds mit green fluorescent protein (GFP)<sup>+</sup> Gefäßfragmenten gezeigt werden, dass die neu entstandenen Gefäßnetzwerke innerhalb der Scaffolds jedoch fast ausschließlich durch die besiedelten Gefäßfragmente und nicht durch eingewachsene Gefäße ausgebildet werden [Laschke et al., 2012b; 2015]. Am 6. Tag nach der Implantation der Scaffolds in die Rückenhautkammern konnten erste perfundierte ROIs innerhalb der Scaffolds nachgewiesen werden. Allerdings gab es signifikante Unterschiede in der Quantität und Ausreifung der neu entstandenen Gefäßnetzwerke zwischen den beiden Gruppen.

Es konnte gezeigt werden, dass Scaffolds, die mit Gefäßfragmenten aus alten Spendermäusen prävasikularisiert wurden, zwischen dem 6. und 14. Tag sowohl im Randbereich als auch im Zentrum signifikant schlechter perfundiert waren als Scaffolds mit Gefäßfragmenten adulter Spendermäuse (*Abbildung 9 C und D*). Auch die funktionelle Kapillardichte unterschied sich an Tag 6, 10 und 14 im Randbereich und im Zentrum signifikant zwischen beiden Gruppen (*Abbildung 9 E und F*). Die Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus alten Spendermäusen wiesen im Vergleich zu den Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus adulten Spendermäusen an Tag 6, 10 und 14 sowohl im Randbereich (*Abbildung 9 E*) als auch im Zentrum eine signifikant niedrigere funktionelle Kapillardichte auf (*Abbildung 9 F*).



**Abbildung 9.** (A, B) Intravitale Fluoreszenzmikroskopie (in Blaulicht-Epi-Illumination mit Kontrastverstärkung durch 5 % FITC-markiertes Dextran 150.000) des Zentrums eines nHA/PU-Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus adulten (A) und alten Spendermäusen (B) an Tag 14 nach Implantation in die Rückenhautkammer. Das Scaffold der adulten Spendermaus ist homogen mit FITC-Dextran-markierten Blutgefäßen vaskularisiert und perfundiert (A), wohingegen im Scaffold der alten Spendermaus größere, nicht vaskularisierte bzw. nicht perfundierte Bereiche zu erkennen sind (B, Sternchen). Maßstab: 320  $\mu\text{m}$ . (C-F) Perfundierte ROIs (%) (C, D) und funktionelle Kapillardichte ( $\text{cm}/\text{cm}^2$ ) (E, F) im Randbereich (C, E) und Zentrum (D, F) von Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus adulten (weiße Kreise,  $n = 8$ ) und alten (schwarze Kreise,  $n = 8$ ) Spendermäusen an Tag 0, 3, 6, 10 und 14 nach Implantation in die Rückenhautkammer. Mittelwert  $\pm$  SEM. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. 0d und 3d innerhalb der jeweiligen Gruppe; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. 0d, 3d und 6d innerhalb der jeweiligen Gruppe; <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs. 0d, 3d, 6d und 10d innerhalb der jeweiligen Gruppe; \* $p < 0,05$  vs. adulte Spendermäuse (Kontrolle).

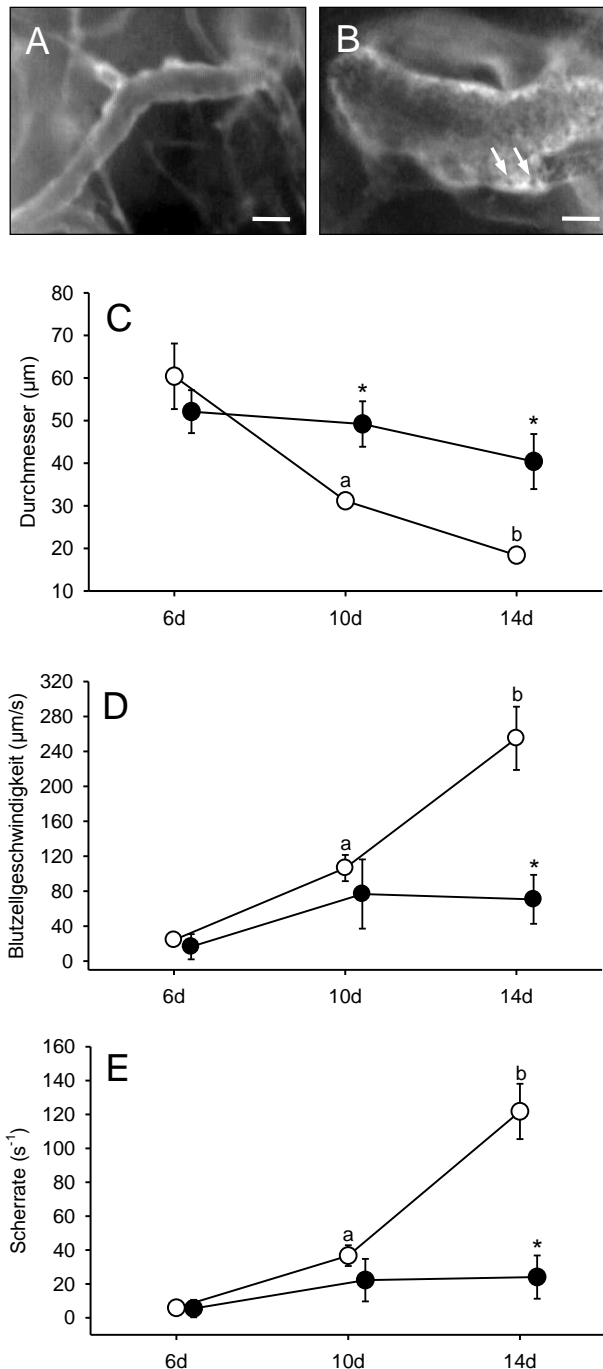
### 6.1.3. Mikrohämodynamik in den Gefäßnetzwerken implantierter Scaffolds

Zur Beurteilung der Funktionalität der neugebildeten Gefäßnetzwerke innerhalb der Scaffolds wurden mikrohämodynamische Parameter einzelner Gefäße bestimmt. Dabei wiesen die perfundierten Gefäße in beiden Gruppen an Tag 6 vergleichbar große Durchmesser von 50 - 60  $\mu\text{m}$  auf, wobei die Gefäßdurchmesser in der Gruppe der adulten Spendermäuse im Zeitverlauf mit  $31 \pm 1 \mu\text{m}$  an Tag 10 und  $18 \pm 1 \mu\text{m}$  an Tag 14 signifikant kleiner wurden (*Abbildung 10 A und C*). Im Gegensatz dazu nahmen die Gefäßdurchmesser in der Gruppe der alten Spendermäuse mit  $49 \pm 5 \mu\text{m}$  an Tag 10 und  $40 \pm 6 \mu\text{m}$  an Tag 14 weniger stark ab (*Abbildung 10 B und C*). Weiterhin konnte in der Gruppe der adulten Spendermäuse eine Zunahme der Blutzellgeschwindigkeit von  $24 \pm 5 \mu\text{m/s}$  an Tag 6 auf  $255 \pm 36 \mu\text{m/s}$  an Tag 14 in den Gefäßnetzwerken innerhalb der Scaffolds beobachtet werden (*Abbildung 10 D*). Somit wurde auch die aus dem Durchmesser und der Blutzellgeschwindigkeit berechnete Scherrate in den Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus adulten Spendermäusen im Zeitverlauf größer (*Abbildung 10 E*). Im Gegensatz dazu blieb die Scherrate in den Gefäßen innerhalb der Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus alten Spendermäusen nahezu unverändert und war mit einem Wert von  $24 \pm 13 \text{ s}^{-1}$  an Tag 14 gegenüber der Kontrollgruppe mit einem Wert von  $122 \pm 16 \text{ s}^{-1}$  signifikant geringer (*Abbildung 10 E*). Dies kann auf die konstant groß bleibenden Gefäßdurchmesser und die gleichbleibend niedrige Blutzellgeschwindigkeit zurückgeführt werden (*Abbildung 10 C und D*).

### 6.1.4. Inkorporation und Inoskulation implantierter Scaffolds

Am letzten Tag der Untersuchung wurden die Rückenhautkammern für histologische und immunhistochemische Analysen entnommen. In der histologischen Auswertung konnte gezeigt werden, dass die Scaffolds beider Gruppen mit neuem Granulationsgewebe durchwachsen waren, wobei die Zelldichte in dem Granulationsgewebe der Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus alten Spendermäusen im Vergleich zu den





**Abbildung 10.** (A, B) Intravitale Fluoreszenzmikroskopie (in Blaulicht-Epi-Illumination mit Kontrastverstärkung durch 5 % FITC-markiertes Dextran 150.000) eines perfundierten Gefäßes im Zentrum eines nHA/PU-Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus adulten (A) und alten Spendermäusen (B) an Tag 14 nach Implantation in die Rückenhautkammer. Das perfundierte Gefäß im Scaffold der alten Spendermaus hat einen deutlich größeren Gefäßdurchmesser und es sind einzelne, gut abgrenzbare Erythrozyten (B, Pfeile) zu erkennen. Dies ist ein Hinweis auf eine reduzierte Blutzellgeschwindigkeit im Gefäßnetzwerk des Scaffolds der alten Spendermaus. Maßstab: 30 µm. (C-E) Durchmesser (µm) (C), Blutzellgeschwindigkeit (µm/s) (D) und Scherrate (s<sup>-1</sup>) (E) perfundierter Blutgefäße im Zentrum der Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus adulten (weiße Kreise, n = 8) und alten (schwarze Kreise, n = 8) Spendermäusen an Tag 6, 10 und 14 nach Implantation in die Rückenhautkammer. Mittelwert ± SEM. <sup>a</sup>p < 0,05 vs. 6d innerhalb der jeweiligen Gruppe; <sup>b</sup>p < 0,05 vs. 6d und 10d innerhalb der jeweiligen Gruppe; \*p < 0,05 vs. adulte Spendermäuse (Kontrolle).

Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus adulten Spendermäusen geringer war (*Abbildung 11 A und B*).

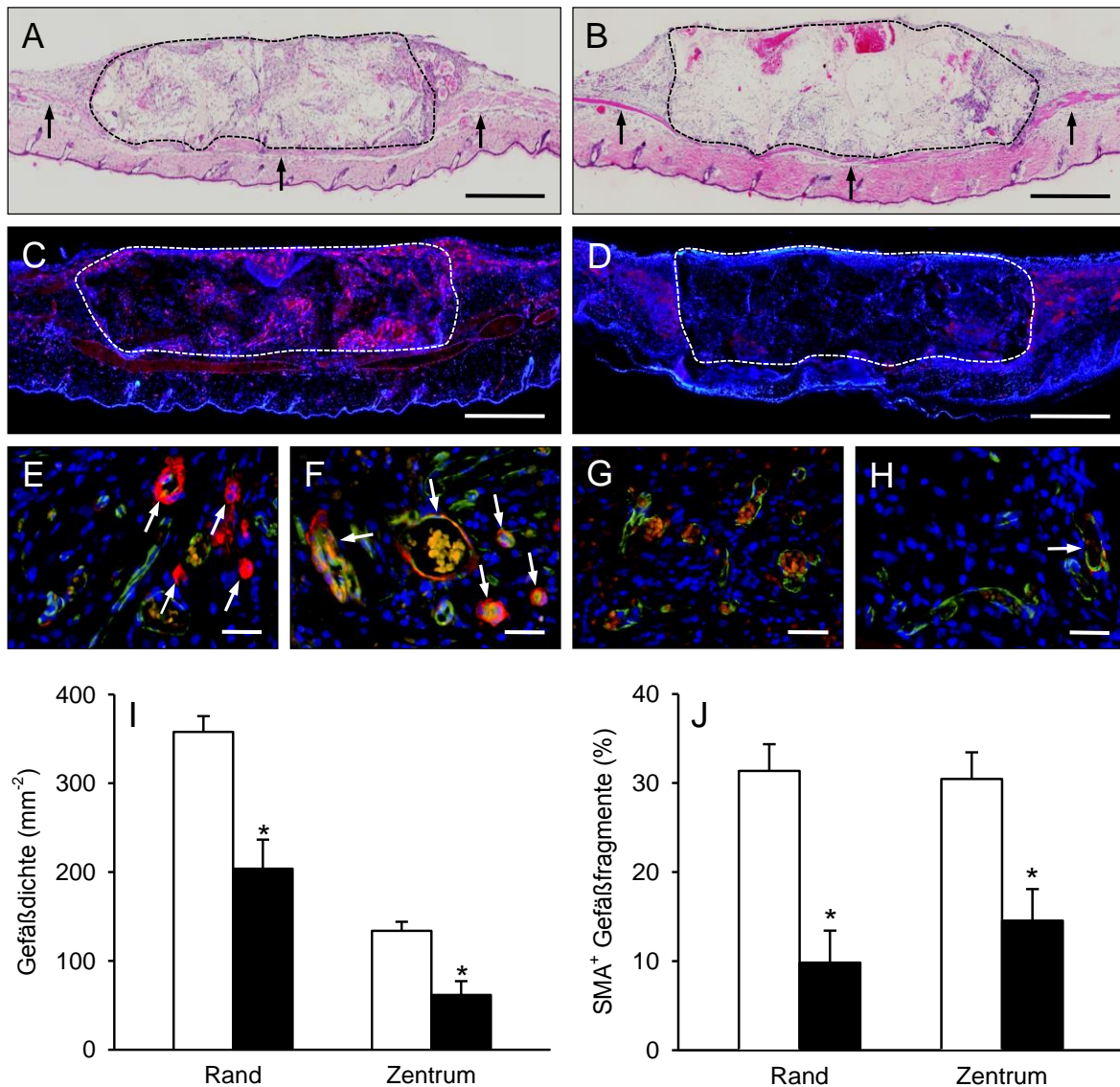
Zusätzlich wurde durch die immunhistochemische Analyse der entnommenen Rückenhautkammern die Gefäßdichte sowie der Anteil  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> Gefäße im Randbereich und im Zentrum der Scaffolds bestimmt. Dabei konnte im Randbereich der Scaffolds, die mit Gefäßfragmenten aus alten Spendermäusen besiedelt waren, eine signifikant geringere Anzahl an Gefäßen ( $204 \pm 33 \text{ mm}^{-2}$ ) detektiert werden als im Randbereich der Scaffolds der Kontrollgruppe ( $358 \pm 18 \text{ mm}^{-2}$ ) (*Abbildung 11 C, D und I*). Auch im Zentrum der Scaffolds mit Gefäßfragmenten der alten Spendermäuse war die Gefäßdichte im Vergleich zu den Scaffolds der Kontrollgruppe (alt:  $62 \pm 16 \text{ mm}^{-2}$  vs. adult:  $134 \pm 10 \text{ mm}^{-2}$ ) signifikant verringert (*Abbildung 11 C, D und I*). Weiterhin konnten in den Scaffolds mit Gefäßfragmenten der alten Spendermäuse im Randbereich (alt:  $10 \pm 4 \%$  vs. adult:  $31 \pm 3 \%$ ) sowie im Zentrum (alt:  $15 \pm 4 \%$  vs. adult:  $30 \pm 3 \%$ ) signifikant weniger  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> Gefäße detektiert werden (*Abbildung 11 E-J*).

#### **6.1.5. Kultivierung mikrovaskulärer Fragmente unter hypoxischen Bedingungen**

In einem zusätzlichen in vitro Experiment wurden mikrovaskuläre Fragmente unter hypoxischen Bedingungen untersucht. Um die hypoxischen Bedingungen in den ersten Stunden nach Implantation der Scaffolds in die Rückenhautkammern zu simulieren, wurden isolierte Gefäßfragmente für 18 Stunden in einer Hypoxiekammer bei konstanter Gasmischung (95 % N<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) und einer Temperatur von 37°C kultiviert. Daraufhin wurde die Menge der aus den kultivierten Gefäßfragmenten freigesetzten Wachstumsfaktoren mittels ELISA bestimmt.

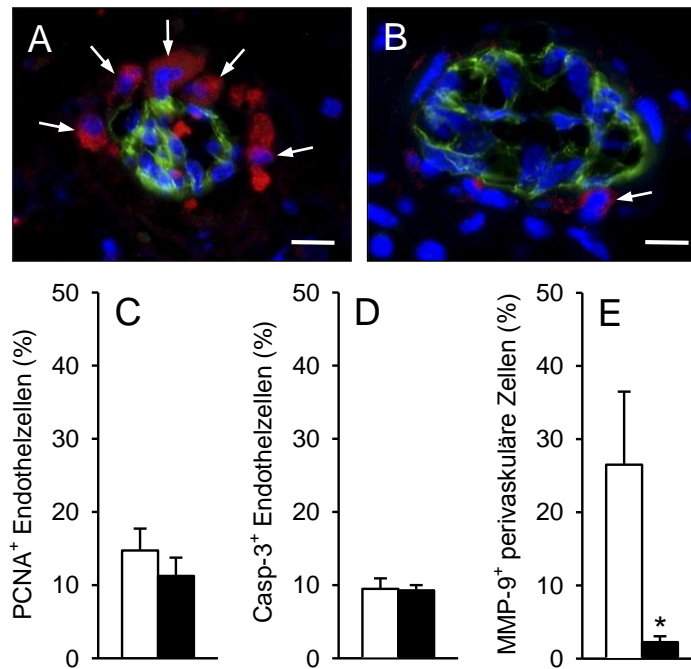
Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass sich auch unter Hypoxie die Menge an freigesetztem VEGF und bFGF zwischen den adulten Spendern (VEGF:  $35 \pm 6 \text{ pg/ml}$ ; bFGF:  $541 \pm 74 \text{ pg/ml}$ ) und den alten Spendern (VEGF:  $28 \pm 4 \text{ pg/ml}$ ; bFGF:  $428 \pm 50 \text{ pg/ml}$ ) nicht signifikant unterschied.

Zusätzlich wurde die proliferative Aktivität und Apoptose von Endothelzellen unter hypoxischen Bedingungen untersucht. Um zwischen Endothelzellen und perivaskulären Zellen unterscheiden zu können, erfolgte in einem ersten Schritt die Färbung der Präparate mit dem Endothelzellmarker CD31. Mittels der Färbung des



**Abbildung 11.** (A, B) HE-Schnitte von nHA/PU-Scaffolds (unterbrochene Linie) mit Gefäßfragmenten aus adulten (A) und alten Spendermäusen (B) an Tag 14 nach Implantation auf den quergestreiften Muskel (Pfeile) der Rückenhautkammer. Das Scaffold mit Gefäßfragmenten der alten Spendermaus (B) ist deutlich schlechter in die Rückenhautkammer inkorporiert. Dies zeigt sich durch die geringere Zelldichte des eingewachsenen Granulationsgewebes in die Poren des Scaffolds (B) im Vergleich zum Scaffold der adulten Spendermaus (A). Maßstab: 650  $\mu$ m. (C, D) Immunhistochemische Darstellung CD31<sup>+</sup> Gefäße (rot) im Zentrum und Randbereich eines Scaffolds (unterbrochene Linie) mit Gefäßfragmenten aus adulten (C) und alten Spendermäusen (D) an Tag 14 nach der Implantation in die Rückenhautkammer. Die Präparate sind zusätzlich mit Hoechst 33342 zur Darstellung der Zellkerne (blau) angefärbt. Es zeigt sich eine deutlich höhere Gefäßdichte in (C) im Vergleich zu (D). Maßstab: 650  $\mu$ m. (E-H) Immunhistochemische Darstellung CD31<sup>+</sup> (grün) und α-SMA<sup>+</sup> (rot) Gefäße im Randbereich (E, G) und Zentrum (F, H) von nHA/PU-Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus adulten (E, F) und alten Spendermäusen (G, H) an Tag 14 nach der Implantation in die Rückenhautkammer. Die Präparate sind zusätzlich mit Hoechst 33342 zur Darstellung der Zellkerne (blau) angefärbt. Es zeigen sich deutlich mehr CD31<sup>+</sup>/α-SMA<sup>+</sup> Gefäße (Pfeile) in (E, F) im Vergleich zu (G, H). Maßstab: 27  $\mu$ m. (I, J) Gefäßdichte (mm<sup>-2</sup>) (I) und α-SMA<sup>+</sup> Gefäße (%) (J) im Randbereich und Zentrum von nHA/PU-Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus adulten (weiße Balken, n = 8) und alten Spendermäusen (schwarze Balken, n = 8) an Tag 14 nach Implantation in die Rückenhautkammer. Mittelwert  $\pm$  SEM. \*p < 0,05 vs. adulte Spendermäuse (Kontrolle).

Proliferationsmarkers PCNA und des Apoptosemarkers Casp-3 wurde anschließend der Anteil der proliferierenden und apoptotischen Zellen bestimmt. Es konnte dabei jedoch kein Unterschied in der Anzahl proliferativer und apoptotischer Zellen zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (*Abbildung 12 C und D*).



**Abbildung 12.** (A, B) Immunhistochemische Darstellung CD31<sup>+</sup> (grün) und MMP-9<sup>+</sup> Zellen (rot) in isolierten Gefäßfragmenten aus adulten (A) und alten Spendermäusen (B) nach Besiedlung auf nHA/PU-Scaffolds und 18-stündiger Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen. Die Präparate sind zusätzlich mit Hoechst 33342 zur Darstellung der Zellkerne (blau) angefärbt. Es zeigen sich deutlich mehr MMP-9<sup>+</sup> perivaskuläre Zellen (Pfeile) im isolierten Gefäßfragment in (A) im Vergleich zu (B). Maßstab: 11  $\mu$ m. (C-E) PCNA<sup>+</sup> Endothelzellen (%) (C), Casp-3<sup>+</sup> Endothelzellen (%) (D) und MMP-9<sup>+</sup> perivaskuläre Zellen (%) (E) in isolierten Gefäßfragmenten aus adulten Spendermäusen (weiße Balken, n = 4) und alten Spendermäusen (schwarze Balken, n = 4) nach Besiedlung auf nHA/PU-Scaffolds und 18-stündiger Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen. Mittelwert  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs. adulte Spendermäuse (Kontrolle).

In einem weiteren Versuch wurden die Präparate mit einem Ak gegen MMP-9 angefärbt (*Abbildung 12 A und B*). MMP-9 ist ein wichtiger Regulator der Angiogenese, der an der Auflösung der extrazellulären Matrix beteiligt ist. MMP-9 wurde unter Hypoxie in beiden Gruppen in weniger als 1 % aller Endothelzellen exprimiert. Allerdings war die Anzahl der MMP-9<sup>+</sup> perivaskulären Zellen in Gefäßfragmenten aus

alten Spendern im Vergleich zu denen aus adulten Spendern signifikant erniedrigt (alt:  $2 \pm 1$  % vs. adult:  $27 \pm 10$  %) (*Abbildung 12 A, B und E*).

### **6.1.6. Durchflusszytometrische Analyse mikrovaskulärer Fragmente**

Um den Stammzellgehalt isolierter Gefäßfragmente in Abhängigkeit vom Alter der Spendermäuse zu untersuchen, wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass  $7 \pm 3$  % der Zellen aus isolierten Gefäßfragmenten alter Spendermäuse den Stammzellmarker CD73 und  $2 \pm 1$  % den Stammzellmarker CD117 exprimierten. Zusätzlich enthielten sie auch  $2 \pm 0$  % Sca-1<sup>+</sup>/VEGFR-2<sup>+</sup> EPCs. Der Stammzellgehalt in den isolierten Gefäßfragmenten alter Spendermäuse unterschied sich hierbei nicht signifikant zum Stammzellgehalt isolierter Gefäßfragmente adulter Spendermäuse (CD73:  $6 \pm 3$  %; CD117:  $1 \pm 0$  %; Sca-1<sup>+</sup>/VEGFR-2<sup>+</sup>:  $2 \pm 0$  %).

## **6.2. Vaskularisierung implantierter Scaffolds nach lokaler Applikation von MALP-2**

### **6.2.1. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion**

Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in den Venolen des Rückenhautkammergewebes (*Abbildung 13 A-D*) und die Vaskularisierung implantierter Scaffolds (*Abbildung 14 A-D*) nach lokaler Applikation von MALP-2 untersucht. Hierzu wurde das Deckglas der Rückenhautkammer 30 Minuten vor Implantation der Scaffolds entfernt und Vehikel oder MALP-2 auf das freiliegende Gewebe appliziert. Mithilfe repetitiver intravitaler Fluoreszenzmikroskopie, histologischer und immunhistochemischer Verfahren erfolgte anschließend die Analyse der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und der Vaskularisierung der Scaffolds über einen Zeitraum von 14 Tagen.

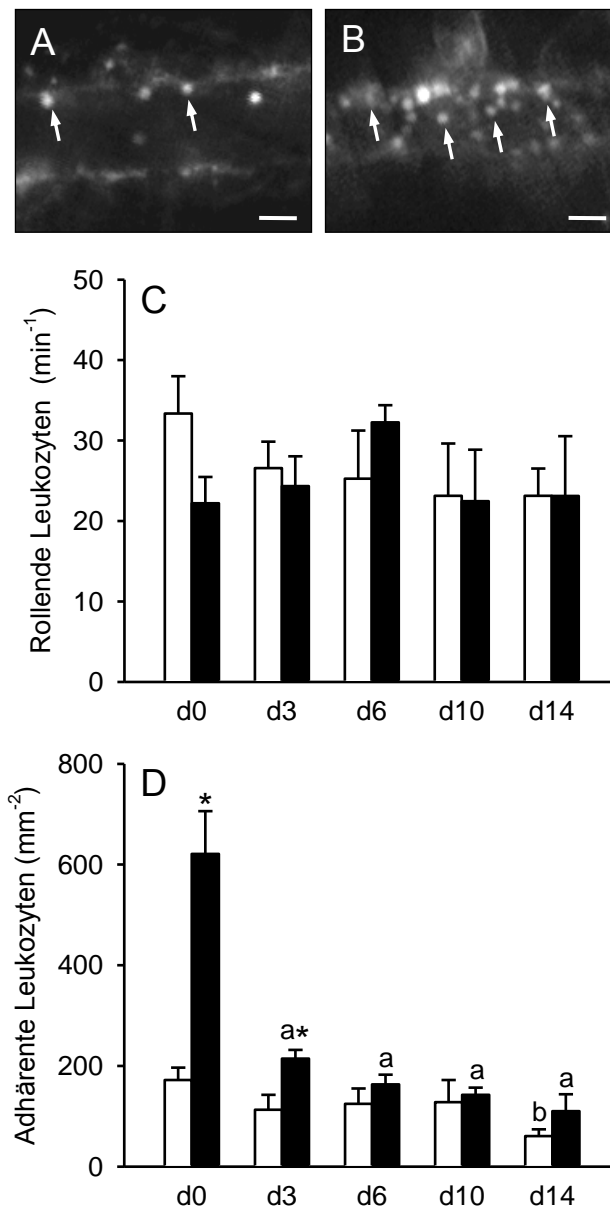
Es konnte kein Unterschied im Durchmesser, der Blutzellgeschwindigkeit und der Scherrate in den untersuchten Venolen zwischen der MALP-2-Gruppe und Vehikel-Gruppe festgestellt werden (*Tabelle 1*). Die Anzahl der rollenden Leukozyten lag an allen Versuchstagen bei  $22 - 33 \text{ min}^{-1}$  ohne signifikanten Unterschied zwischen den

beiden Versuchsgruppen (*Abbildung 13 C*). Die lokale Applikation von MALP-2 hatte somit keinen Einfluss auf die Anzahl der rollenden Leukozyten. Die Anzahl adhärenter Leukozyten war jedoch innerhalb der ersten drei Tage nach der Applikation von MALP-2 signifikant erhöht (*Abbildung 13 A, B und D*). Dabei war die Anzahl der adhärenter Leukozyten direkt nach Applikation von MALP-2 mit  $621 \pm 85 \text{ mm}^{-2}$  am höchsten, wobei sich diese nach dem dritten Tag wieder auf physiologische Werte unter  $200 \text{ mm}^{-2}$  normalisierte (*Abbildung 13 D*).

Diese Ergebnisse sprechen für eine temporäre Entzündungsreaktion in den Rückenhautkammern nach lokaler Applikation von MALP-2 [Rücker *et al.*, 2006; Laschke *et al.*, 2010b]. In der Kontrollgruppe hingegen lag die Anzahl der adhärenter Leukozyten über den gesamten Versuchszeitraum im physiologischen Bereich mit Werten von weniger als  $200 \text{ mm}^{-2}$  (*Abbildung 13 D*).

	0d	3d	6d	10d	14d
<b>Durchmesser [<math>\mu\text{m}</math>]:</b>					
Kontrolle	$43,4 \pm 1,7$	$41,7 \pm 2,7$	$43,6 \pm 2,7$	$45,7 \pm 8,2$	$36,4 \pm 1,3$
MALP-2	$41,9 \pm 1,6$	$40,6 \pm 1,1$	$41,8 \pm 1,7$	$43,7 \pm 1,5$	$39,4 \pm 1,2$
<b>Blutzellgeschwindigkeit [<math>\mu\text{m/s}</math>]:</b>					
Kontrolle	$702,9 \pm 68,4$	$711,6 \pm 132,7$	$764,3 \pm 129,2$	$704,8 \pm 102,7$	$588,1 \pm 37,5$
MALP-2	$597,2 \pm 70,0$	$511,2 \pm 56,6$	$644,7 \pm 100,9$	$481,8 \pm 117,2$	$720,5 \pm 62,1$
<b>Scherrate [<math>\text{s}^{-1}</math>]:</b>					
Kontrolle	$133,1 \pm 18,1$	$135,3 \pm 23,1$	$140,1 \pm 21,3$	$130,7 \pm 22,9$	$130,2 \pm 9,4$
MALP-2	$116,1 \pm 14,9$	$100,0 \pm 10,1$	$126,4 \pm 22,6$	$86,6 \pm 19,5$	$146,5 \pm 20,6$

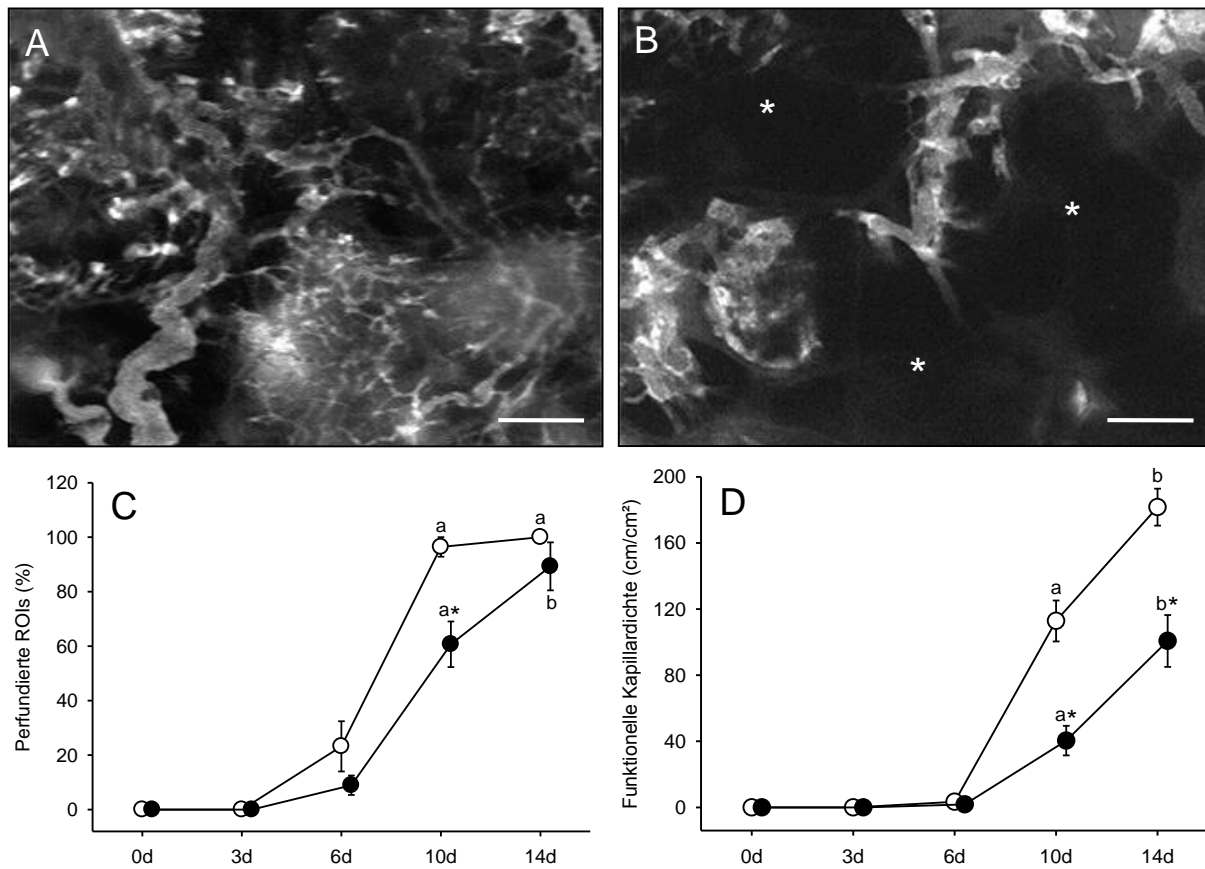
**Tabelle 1.** Durchmesser ( $\mu\text{m}$ ), Blutzellgeschwindigkeit ( $\mu\text{m/s}$ ) und Scherrate ( $\text{s}^{-1}$ ) von Venolen innerhalb der Rückenhautkammer direkt nach der Implantation der Scaffolds (0d) sowie an Tag 3, 6, 10 und 14. 30 Minuten vor der Implantation der Scaffolds erfolgte die lokale Applikation von MALP-2 ( $n = 7$ ) oder Vehikel (Kontrolle;  $n = 7$ ) auf das Empfängergewebe der Rückenhautkammer. Mittelwert  $\pm$  SEM.



**Abbildung 13.** (A, B) Intravitale Fluoreszenzmikroskopie (in Grünlicht-Epi-Illumination durch Rhodamin 6G zur Anfärbung der Leukozyten *in vivo*) von Venolen der Rückenhautkammer direkt nach Implantation der Scaffolds. 30 Minuten vor der Implantation der Scaffolds erfolgte die lokale Applikation von Vehikel (Kontrolle) (A) und MALP-2 (B) auf das Gewebe der Rückenhautkammer. In der Venole der MALP-2-Gruppe zeigen sich deutlich mehr adhärenente Leukozyten (Pfeile) (B) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Pfeile) (A). Maßstab: 22 μm. (C, D) Anzahl rollender Leukozyten (min<sup>-1</sup>) (C) und adhärenente Leukozyten (mm<sup>-2</sup>) (D) in Venolen der Rückenhautkammer nach lokaler Applikation von Vehikel (weiße Balken, n = 7) und MALP-2 (schwarze Balken, n = 7) an Tag 0, 3, 6, 10 und 14. Mittelwert ± SEM. <sup>a</sup>p < 0,05 vs. d0; <sup>b</sup>p < 0,05 vs. d0, d3, d6 und d10 innerhalb der jeweiligen Gruppe; \*p < 0,05 vs. Vehikel (Kontrolle).

### 6.2.2. Vaskularisierung implantierter Scaffolds

Die Vaskularisierung der Scaffolds nach lokaler Applikation von MALP-2 bzw. Vehikel in die Rückenhautkammer konnte mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie über einen Zeitraum von 14 Tagen in vivo analysiert werden (Abbildung 14 A-D).



**Abbildung 14.** (A, B) Intravitale Fluoreszenzmikroskopie (in Blaulicht-Epi-Illumination mit Kontrastverstärkung durch 5 % FITC-markiertes Dextran 150.000) des Zentrums eines Scaffolds 14 Tage nach lokaler Applikation von Vehikel (A) und MALP-2 (B) auf das Gewebe der Rückenhautkammer. Das Scaffold der Kontrollgruppe ist homogen mit FITC-Dextran-markierten Blutgefäßen vaskularisiert und perfundiert (A), wohingegen in dem Scaffold der MALP-2-Gruppe größere nicht vaskularisierte und nicht perfundierte Bereiche zu erkennen sind (B, Sternchen). Maßstab: 265  $\mu\text{m}$ . (C,D) Perfundierte ROIs (%) (C) und funktionelle Kapillardichte ( $\text{cm}/\text{cm}^2$ ) (D) im Zentrum der Scaffolds an Tag 0, 3, 6, 10 und 14 nach Applikation von Vehikel (weiße Kreise,  $n = 7$ ) und MALP-2 (schwarze Kreise,  $n = 7$ ) in die Rückenhautkammer. Mittelwert  $\pm$  SEM. <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. d0; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. d0, d3, d6 und d10 innerhalb der jeweiligen Gruppe; \* $p < 0,05$  vs. Vehikel (Kontrolle).

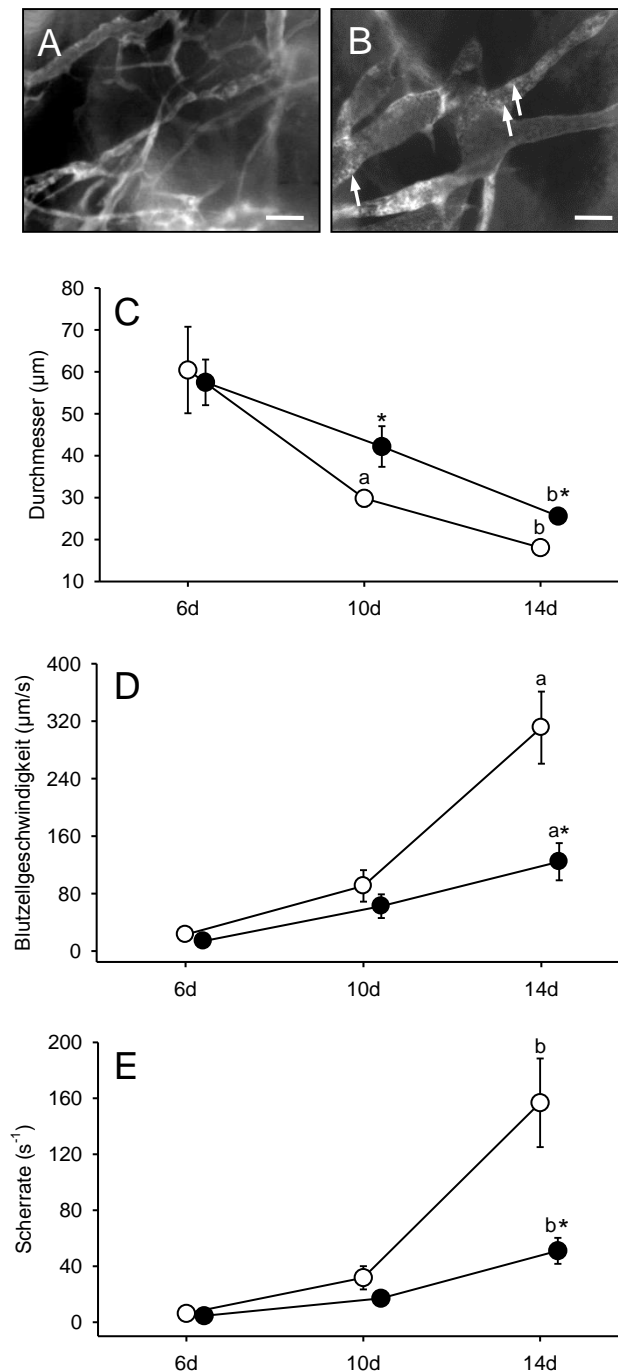
Um die Ausdehnung der neugebildeten Gefäßnetzwerke zu bestimmen, wurden die Anzahl der perfundierten ROIs und die funktionelle Kapillardichte innerhalb der



Scaffolds analysiert. Die ersten perfundierten Gefäße konnten bereits 6 Tage nach Applikation von MALP-2 oder Vehikel innerhalb der Scaffolds in beiden Gruppen intravitalfluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Diese Gefäße waren der Ausgangspunkt für die komplexen Gefäßnetzwerke, welche innerhalb der nächsten Tage in den Implantaten entstanden [Laschke *et al.*, 2012b; 2015]. Es gab allerdings signifikante Unterschiede bei der Vaskularisierung der Scaffolds zwischen beiden Gruppen. Die Auswertung zeigte überraschenderweise, dass die lokale Applikation von MALP-2 das Vaskularisierungspotential isolierter Gefäßfragmente negativ beeinflusst. Dies zeigte sich zum einen durch die geringere Anzahl perfundierter ROIs innerhalb der Scaffolds an Tag 10 ( $61 \pm 8 \%$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $96 \pm 4 \%$ ) (*Abbildung 14 A, B und C*). Zum anderen war auch die funktionelle Kapillardichte in den Scaffolds der MALP-2-Gruppe an Tag 10 ( $40 \pm 9 \text{ cm/cm}^2$ ) und an Tag 14 ( $101 \pm 16 \text{ cm/cm}^2$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $113 \pm 12 \text{ cm/cm}^2$  und  $182 \pm 11 \text{ cm/cm}^2$ ) signifikant reduziert (*Abbildung 14 A, B und D*).

### **6.2.3. Mikrohämodynamik in den Gefäßnetzwerken implantierter Scaffolds**

Zur genaueren Charakterisierung der Gefäßnetzwerke in den implantierten Scaffolds wurde der Durchmesser, die Blutzellgeschwindigkeit und die Scherrate perfundierter Gefäße untersucht (*Abbildung 15 A-E*). Dabei wiesen die perfundierten Gefäße innerhalb der Scaffolds in beiden Gruppen an Tag 6 vergleichbar große Durchmesser von  $\sim 60 \mu\text{m}$  auf, wobei die Gefäßdurchmesser in der Kontrollgruppe im Zeitverlauf mit  $30 \pm 2 \mu\text{m}$  an Tag 10 und  $18 \pm 1 \mu\text{m}$  an Tag 14 signifikant kleiner wurden (*Abbildung 15 A und C*). Im Gegensatz dazu nahmen die Gefäßdurchmesser in den Gefäßen der MALP-2-Gruppe im Zeitverlauf mit  $42 \pm 5 \mu\text{m}$  an Tag 10 und  $25 \pm 1 \mu\text{m}$  an Tag 14 weniger deutlich ab (*Abbildung 15 B und C*). Zudem konnte in der Kontrollgruppe eine Zunahme der Blutzellgeschwindigkeit in den Netzwerken von  $23 \pm 7 \mu\text{m/s}$  an Tag 6 auf  $311 \pm 50 \mu\text{m/s}$  an Tag 14 beobachtet werden (*Abbildung 15 D*). Somit wurde auch die aus dem Durchmesser und der Blutzellgeschwindigkeit berechnete Scherrate in den Gefäßen innerhalb der Scaffolds der Kontrollgruppe im Zeitverlauf mit einem Maximum von  $157 \pm 32 \text{ s}^{-1}$  an Tag 14 größer (*Abbildung 15 E*).

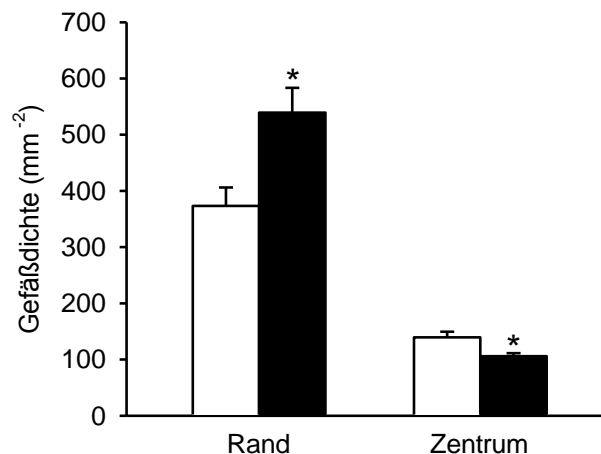


**Abbildung 15.** (A, B) Intravitale Fluoreszenzmikroskopie (in Blaulicht-Epi-Illumination mit Kontrastverstärkung durch 5 % FITC-markiertes Dextran 150.000) perfundierter Gefäße im Zentrum eines nHA/PU-Scaffolds 14 Tage nach lokaler Applikation von Vehikel (A) und MALP-2 (B) auf das Gewebe der Rückenhautkammer. Die perfundierten Gefäße im Scaffold der MALP-2-Gruppe haben einen deutlich größeren Gefäßdurchmesser und es sind einzelne, gut abgrenzbare Erythrozyten (B, Pfeile) zu erkennen, was ein Hinweis für eine reduzierte Blutzellgeschwindigkeit ist. Maßstab: 65 µm. (C-E) Durchmesser (µm) (C), Blutzellgeschwindigkeit (µm/s) (D) und Scherrate (s<sup>-1</sup>) (E) perfundierter Blutgefäße im Zentrum der Scaffolds an Tag 6, 10 und 14 nach lokaler Applikation von Vehikel (weiße Kreise, n = 7) und MALP-2 (schwarze Kreise, n = 7) auf das Gewebe der Rückenhautkammer. Mittelwert ± SEM. <sup>a</sup>p < 0,05 vs. 6d; <sup>b</sup>p < 0,05 vs. 6d und 10d innerhalb der jeweiligen Gruppe; \*p < 0,05 vs. Vehikel (Kontrolle).

Im Gegensatz dazu blieb die Scherrate in den Gefäßen der MALP-2-Gruppe nahezu unverändert und war an Tag 14 mit einem Wert von  $51 \pm 9 \text{ s}^{-1}$  gegenüber der Kontrollgruppe signifikant verringert (*Abbildung 15 E*). Dies kann auf die konstanten Gefäßdurchmesser und die langsam steigende Blutzellgeschwindigkeit von  $14 \pm 7 \text{ µm/s}$  an Tag 6 auf  $124 \pm 26 \text{ µm/s}$  an Tag 14 in den Gefäßnetzwerken der MALP-2-Gruppe zurückgeführt werden (*Abbildung 15 C und D*).

#### 6.2.4. Inkorporation und Inoskulation implantierter Scaffolds

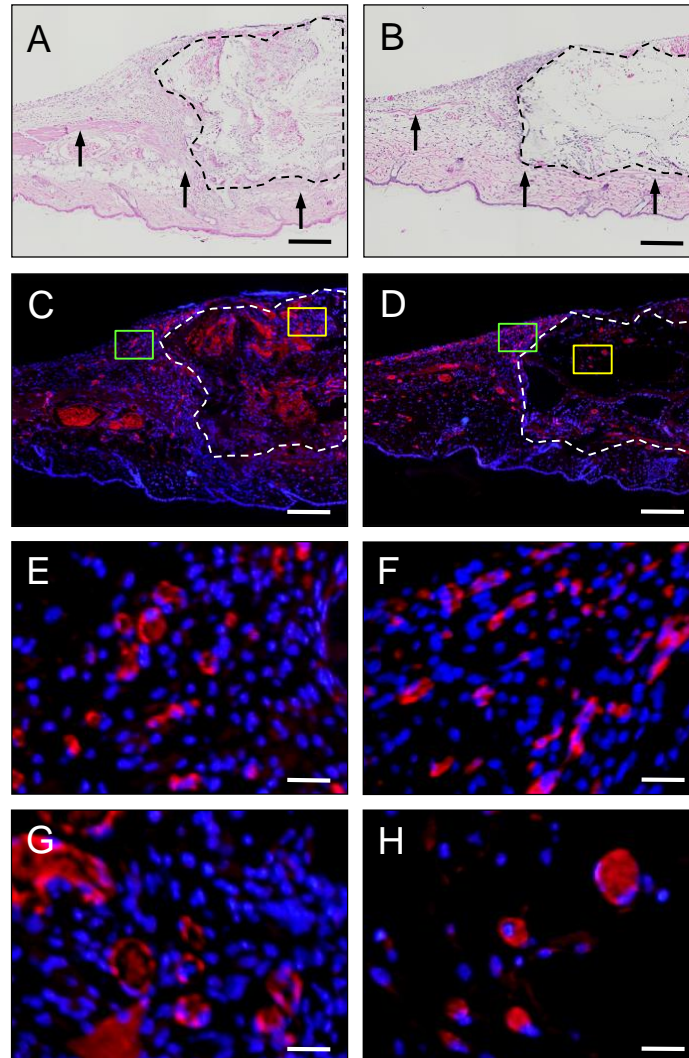
In der histologischen Auswertung (*Abbildungen 16 und 17*) konnte gezeigt werden, dass die Scaffolds beider Gruppen mit neuem Granulationsgewebe durchwachsen waren, wobei die Zelldichte des Granulationsgewebes im Zentrum der Scaffolds der MALP-2-Gruppe geringer war als in der Kontrollgruppe (*Abbildung 17 A und B*). Die Inkorporation der Scaffolds in die Rückenhautkammer war in der MALP-2-Gruppe somit schlechter als in der Kontrollgruppe.



**Abbildung 16.** Gefäßdichte ( $\text{mm}^{-2}$ ) im Randbereich und Zentrum von nHA/PU-Scaffolds 14 Tage nach lokaler Applikation von Vehikel (weiße Balken,  $n = 7$ ) und MALP-2 (schwarze Balken,  $n = 7$ ) auf das Gewebe der Rückenhautkammer. Mittelwert  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs. Vehikel (Kontrolle).

Zusätzlich wurde durch die immunhistochemische Analyse der entnommenen Rückenhautkammern der Anteil  $\text{CD31}^+$  Gefäße im Randbereich und Zentrum der Scaffolds bestimmt (*Abbildung 16; Abbildung 17 C-H*). Dabei konnte im Randbereich der Scaffolds der MALP-2-Gruppe eine höhere Dichte an Gefäßen ( $539 \pm 44 \text{ mm}^{-2}$ )

detektiert werden als im Randbereich der Scaffolds der Kontrollgruppe ( $373 \pm 33 \text{ mm}^{-2}$ ).

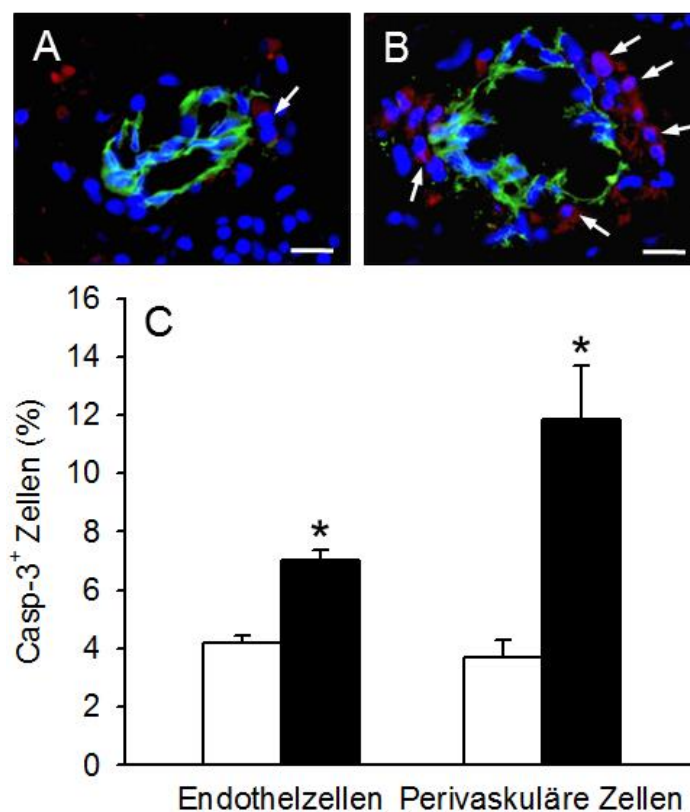


**Abbildung 17.** (A, B) HE-Schnitte eines nHA/PU-Scaffolds (unterbrochene Linie) auf dem quer-gestreiften Hautmuskel der Rückenhautkammer (Pfeile) 14 Tage nach lokaler Applikation von Vehikel (A) und MALP-2 (B). Das Scaffold der MALP-2-Gruppe ist deutlich schlechter in die Rücken-hautkammer inkorporiert. Dies zeigt sich durch die geringere Zelldichte des eingewachsenen Granulations-gewebes in die Poren des Scaffolds in (B) im Vergleich zur Kontrolle (A). Maßstab:  $225 \mu\text{m}$ . (C-H) Immunhistochemische Darstellung  $\text{CD31}^+$  Gefäße (rot) im Randbereich (E, F = Vergrößerung des grünen Rechtecks in C, D) und im Zentrum (G, H = Vergrößerung des gelben Rechtecks in C, D) eines nHA/PU-Scaffolds (unterbrochene Linie) 14 Tage nach lokaler Applikation von Vehikel (C) und MALP-2 (D) auf das Gewebe der Rückenhautkammer. Maßstab C, D:  $225 \mu\text{m}$ . Die Schnitte sind zusätzlich mit Hoechst 33342 zur Darstellung der Zellkerne (blau) angefärbt. Es zeigt sich eine deutlich höhere Gefäßdichte im Randbereich der Scaffolds nach Applikation von MALP-2 (F) im Vergleich zur Kontrolle (E). Im Gegensatz dazu zeigt sich eine deutlich geringere Gefäßdichte im Zentrum der Scaffolds nach Applikation von MALP-2 (H) im Vergleich zur Kontrolle (G). Maßstab E-H:  $22 \mu\text{m}$ .

Dies erklärt sich durch den positiven Effekt von MALP-2 auf die angiogene Reaktion des Kammergewebes. Im Gegenteil dazu war die Gefäßdichte im Zentrum der Scaffolds der MALP-2-Gruppe ( $106 \pm 5 \text{ mm}^{-2}$ ) geringer als in den Scaffolds der Kontrollgruppe ( $139 \pm 10 \text{ mm}^{-2}$ ). Die histologische Auswertung spiegelt somit die Ergebnisse der Auswertung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie wider.

### 6.2.5. Effekt von MALP-2 auf die Viabilität isolierter Gefäßfragmente

In zusätzlichen in vitro Experimenten wurde die Anzahl Casp-3<sup>+</sup> perivaskulärer und endothelialer Zellen in isolierten Gefäßfragmenten bestimmt (Abbildung 18 A-C). Diese wurden hierzu für 24 h in EC Medium mit MALP-2 (3,3 µg/ml) oder Vehikel in-



**Abbildung 18.** (A, B) Immunhistochemische Darstellung Casp-3<sup>+</sup> Zellen (rot) in isolierten Gefäßfragmenten nach 24-stündiger Kultivierung in EC Medium mit Vehikel (A) und MALP-2 (B). Die Schnitte sind zusätzlich mit einem Ak gegen CD31 zur Darstellung der Endothelzellen (grün) und Hoechst 33342 zur Darstellung der Zellkerne (blau) angefärbt. Es zeigen sich deutlich mehr Casp-3<sup>+</sup> Zellen (Pfeile) im isolierten Gefäßfragment der MALP-2-Gruppe (B, Pfeile) im Vergleich zur Kontrollgruppe (A, Pfeile). Maßstab: 18 µm. (C) Casp-3<sup>+</sup> Endothelzellen und perivaskuläre Zellen (%) in isolierten Gefäßfragmenten nach 24-stündiger Kultivierung in EC Medium mit Vehikel (weiße Balken, n = 3) und MALP-2 (schwarze Balken, n = 3). Mittelwert  $\pm$  SEM. \*p < 0,05 vs. Vehikel (Kontrolle).

kubiert. Dabei lag der prozentuale Anteil apoptotischer perivaskulärer Zellen in der Kontrollgruppe bei  $4 \pm 1$  % und in der MALP-2-Gruppe bei  $12 \pm 2$  % (*Abbildung 18 C*). Der prozentuale Anteil apoptotischer endothelialer Zellen lag in der Kontrollgruppe bei  $4 \pm 0$  % und in der MALP-2-Gruppe bei  $7 \pm 0$  % (*Abbildung 18 C*). Somit konnte gezeigt werden, dass Gefäßfragmente, die für 24 Stunden mit MALP-2 inkubiert werden, signifikant mehr apoptotische perivaskuläre Zellen und Endothelzellen enthalten als Vehikel-exponierte Gefäßfragmente.

### 6.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem ersten Studienabschnitt das Vaskularisierungspotential isolierter Gefäßfragmente in Abhängigkeit vom Alter der Fettgewebsspender untersucht. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Sowohl die Besiedlung von Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus adulten als auch aus alten Spendermäusen führte zu einer Vaskularisierung nach Implantation in das Gewebe der Rückenhautkammer. Die Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus adulten Spendermäusen werden allerdings im Zentrum und im Randbereich signifikant besser vaskularisiert. Zudem weisen sie nach 14 Tagen ausgereifere Gefäßnetzwerke auf. Dies zeigt sich durch kleinere Gefäßdurchmesser, eine erhöhte Blutzellgeschwindigkeit und eine erhöhte Scherrate.
2. Isolierte Gefäßfragmente sind eine Mischung aus Arteriolen, Kapillaren, Venolen und Stammzellen. In der durchflusszytometrischen Analyse isolierter Gefäßfragmente konnte kein Unterschied in der Anzahl von CD73<sup>+</sup> Zellen und CD117<sup>+</sup> Zellen zwischen adulten und alten Spendermäusen festgestellt werden. Somit unterscheidet sich der Stammzellgehalt in isolierten Gefäßfragmenten aus adulten und alten Spendermäusen nicht signifikant voneinander.
3. Die Vaskularisierung im Inneren von Gefäßfragment-besiedelten Scaffolds erfolgt primär durch den Zusammenschluss der einzelnen Gefäßfragmente zu einem komplexen Gefäßnetzwerk. Direkt nach der Implantation der Scaffolds in Gewebedefekte sind besonders die Zellen im Inneren der Implantate einem

starken hypoxischen Stress ausgesetzt. Die Kultivierung isolierter Gefäßfragmente für 18 Stunden unter hypoxischen Bedingungen zeigt jedoch, dass die initiale Hypoxie keinen Einfluss auf die Anzahl PCNA<sup>+</sup> und Casp-3<sup>+</sup> Zellen in den beiden Gruppen hat. Es kann allerdings eine signifikant erhöhte Expression von MMP-9 in den perivaskulären Zellen der Gefäßfragmente aus adulten Spendermäusen detektiert werden. Dies ist eine mögliche Erklärung für die bessere Vaskularisierung der Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus adulten Spendermäusen.

In einem zweiten Studienabschnitt wurde die Vaskularisierung Gefäßfragment-besiedelter Scaffolds und die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in der Rückenhautkammer nach lokaler Applikation von MALP-2 untersucht. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

4. Die lokale Applikation von MALP-2 führt zu einer temporär erhöhten Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in den Venolen des Kammergewebes. Die Anzahl der adhärenenten Leukozyten normalisiert sich dabei nach drei Tagen wieder auf physiologische Werte.
5. Die lokale Applikation von MALP-2 auf das Kammergewebe vor der Implantation der Gefäßfragment-besiedelten Scaffolds verbessert deren Vaskularisierung im Randbereich. Die Vaskularisierung im Inneren der Scaffolds wird durch die lokale Applikation von MALP-2 allerdings gehemmt. Auch die Ausreifung der mikrovaskulären Netzwerke innerhalb der Scaffolds wird negativ beeinflusst. Dies zeigt sich durch konstant große Gefäßdurchmesser, eine langsamere Blutzellgeschwindigkeit und eine niedrigere Scherrate im Vergleich zu Vehikel-behandelten Kontrollen.
6. MALP-2 ist ein pro-angiogener Faktor der nach lokaler Applikation in einen Gewebedeffect zur verbesserten Vaskularisierung im Randbereich implantierter, Gefäßfragment-besiedelter Scaffolds beiträgt. Gleichzeitig verschlechtert MALP-2 die Vaskularisierung im Inneren der Scaffolds. MALP-2 führt dabei vermehrt zur Apoptose von perivaskulären Zellen und Endothelzellen der isolierten Gefäßfragmente.

## 7. Diskussion

### 7.1. Diskussion von Material und Methodik

#### 7.1.1. Modell der Rückenhautkammer

1943 legte Algire [1943] die Grundlage für das Modell der Rückenhautkammer, indem er das Modell des chronischen Beobachtungsfensters am Kaninchenohr von Sandison [Sandison, 1928] weiterentwickelte und auf die Maus übertrug. Die Rückenhautkammer wurde fortwährend weiterentwickelt und in einer Vielzahl von Studien zur in vivo Analyse der Mikrozirkulation unter physiologischen und pathologischen Bedingungen verwendet [Sckell und Leunig, 2016]. Eine weitere Möglichkeit zur in vivo Analyse der Mikrozirkulation bieten sogenannte „Akut-Präparationen“ von Geweben, beispielsweise zur Darstellung der pulmonalen [Tabuchi et al., 2008; Wang et al., 2009] oder mesenterialen Mikrozirkulation [Zweifach, 1973]. „Akut-Präparationen“ erlauben jedoch nur Untersuchungen über Stunden an narkotisierten Versuchstieren. Am Ende der Untersuchung muss das Versuchstier aufgrund der Schwere des Eingriffs und der Invasivität der Gewebepräparation eingeschläfert werden. Der Vorteil des Modells der Rückenhautkammer gegenüber den „Akut-Präparationen“ besteht darin, dass die Mikrozirkulation nicht invasiv und unter physiologischen Bedingungen über einen längeren Zeitraum von 2 - 3 Wochen mittels repetitiver intravitaler Fluoreszenzmikroskopie in vivo dargestellt werden kann [Lehr et al., 1993].

Im Modell der Rückenhautkammer wird der Hautmuskel (M. panniculus carnosus) der Rückenhautfalte mikrochirurgisch präpariert, wodurch die Mikrozirkulation des Muskels und des darunterliegenden subkutanen Gewebes bestehend aus Arteriolen, Kapillaren und Venolen mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden kann. So können auch mikrohämodynamische Parameter wie der Gefäßdurchmesser, die Blutzellgeschwindigkeit und die Scherrate in den perfundierten Blutgefäßen der Rückenhautkammer gemessen werden. Zusätzlich können durch die intravenöse Gabe spezieller Fluoreszenzfarbstoffe wie Rhodamin 6G Leuko-



zyten-Endothelzell-Interaktionen in den Gefäßen und somit entzündliche Prozesse im Gewebe der Rückenhautkammer beurteilt werden [Menger *et al.*, 1992]. Das chirurgische Trauma, das durch die Implantation der Rückenhautkammer verursacht wird, hat mögliche Einflüsse auf die angiogene und entzündliche Reaktion des Gewebes auf externe Stimuli. Um diesen Effekt zu minimieren und so eine Verfälschung der erhobenen Daten zu verhindern, muss nach der Operation eine Erholungsphase von 48 Stunden für die Versuchstiere eingehalten werden.

Ein Deckglas schützt das freigelegte Gewebe nach der Operation im Bereich des Beobachtungsfensters der Rückenhautkammer vor äußerem Trauma und Austrocknung. Gleichzeitig kann das Deckglas schnell und leicht entfernt werden, wodurch zu jedem Zeitpunkt die Möglichkeit besteht, verschiedene Biomaterialien oder aber andere Gewebe in die Rückenhautkammer zu implantieren und die entzündliche und angiogene Reaktion des Empfängergewebes auf die Implantate zu untersuchen. So können beispielsweise neu entstandene Gefäßnetzwerke in Scaffolds analysiert und die erhobenen Daten mit den Ergebnissen früherer Studien verglichen werden [Laschke *et al.*, 2005]. Neben Biomaterialien können auch Angiogenese-stimulierende Substanzen leicht auf das freipräparierte Gewebe der Rückenhautkammer appliziert werden [Laschke *et al.*, 2014a]. Das Modell der Rückenhautkammer eignet sich somit besonders gut zur Erforschung neuer Methoden, welche die Vaskularisierung implantierter Scaffolds verbessern sollen.

Aufgrund der Größe der Rückenhautkammer können nur sehr kleine Scaffolds mit einer Größe von  $\sim 3 \times 3 \times 1$  mm untersucht werden. Die Vaskularisierung von soliden, lichtundurchlässigen Implantaten kann mit der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie zudem nur oberflächlich visualisiert werden. Deshalb wurden die Scaffolds in dieser Studie am Ende der 14-tägigen Beobachtungszeit für zusätzliche histologische und immunhistochemische Untersuchungen entnommen, so dass auch eine Beurteilung der Vaskularisierung im Inneren der Implantate möglich war.

### 7.1.2. Scaffolds

Die in den Versuchen verwendeten nHA/PU-Scaffolds stammten aus dem AO Research Institut in Davos, Schweiz, und wurden mit der sogenannten Salz-Auswasch-Umkehr-Methode hergestellt [Gorna und Gogolewski, 2006; Boissard *et al.*, 2009]. Mit dieser Methode kann die Porengröße und Porosität durch die Menge

und die Größe der zuvor beigemischten Salzkristalle genau definiert werden. Es wurden Scaffolds mit einer 90 %-igen Porosität, einer Porengröße von 200 µm und einer Wandstärke von 31 µm verwendet. Durch diese Morphologie wird das Einwachsen von Blutgefäßen und Granulationsgewebe in die Scaffolds optimal gefördert [Druecke et al., 2004; Laschke et al., 2010a; Laschke et al., 2011]. Zudem enthalten die Scaffolds keine zytotoxisch wirksamen Komponenten und verfügen über eine sehr gute Biokompatibilität [Laschke et al., 2010b]. Die in dieser Arbeit verwendeten Scaffolds wiesen eine initiale Größe von 2 x 9 cm auf und wurden daher auf die benötigte Größe für die Experimente zugeschnitten, wobei die Qualität und die gleichmäßige Architektur erhalten blieb. In die Rückenhautkammer können nur relativ kleine Scaffolds von ~3 x 3 x 1 mm implantiert werden. Da Scaffolds in der klinischen Anwendung in größere Gewebedefekte, wie beispielsweise mehrere cm große Knochendefekte implantiert werden müssen [Johnson et al., 2011; Krishnan et al., 2014], sollte in weiteren Studien auch die Funktionalität größerer Scaffolds in vivo analysiert werden.

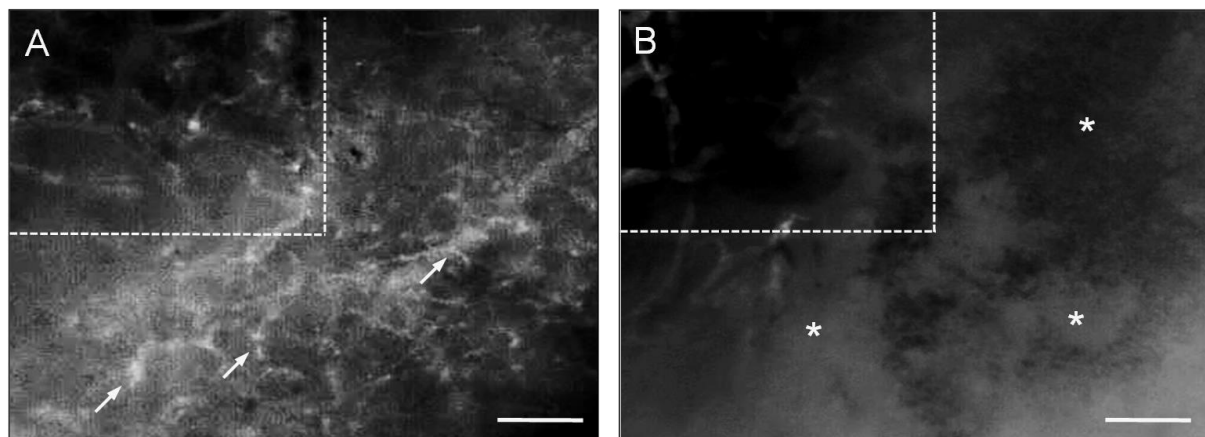
Mittels histologischer Analysen besiedelter Scaffolds konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die verwendete Besiedlungsmethode eine homogene Verteilung der isolierten Gefäßfragmente auf den Scaffolds ermöglichte. Da die Vaskularisierung im Inneren der Scaffolds primär durch die besiedelten Gefäßfragmente erfolgte [Laschke et al., 2012b], ist eine gleichmäßige Verteilung der Gefäßfragmente in den Scaffolds vermutlich eine wichtige Grundvoraussetzung, um eine vollständige Vaskularisierung in kurzer Zeit zu erzielen.

### **7.1.3. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie**

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie ist eine Untersuchungstechnik, die sich besonders zur in vivo Analyse von dynamischen Prozessen wie Gefäßneubildung [Frueh et al., 2017], Entzündung [Laschke et al., 2014a; Grässer et al., 2016], Nekrose und Apoptose [Harris et al., 1996; 1997] sowie Gefäßpermeabilität [Westermann et al., 1999] eignet. In dieser Arbeit wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie zur Analyse der Mikrozirkulation angewendet. Unter Epi-Illumination ist dabei auch eine direkte Visualisierung des Gefäßsystems in nicht transilluminierbaren Organen möglich. Durch die intravenöse Injektion von 0,05 ml 5 % FITC-markiertem Dextran vor jeder Untersuchung konnte die Mikrozirkulation in der

Rückenhautkammer und die Perfusion der neugebildeten mikrovaskulären Netzwerke in den Scaffolds visualisiert werden. Somit war es möglich, die Inoskulation der Scaffolds in der Rückenhautkammer über einen Zeitraum von 14 Tagen in vivo zu beobachten.

Hierzu wurden im ersten Studienabschnitt 8 ROIs im Zentrum und 8 ROIs im Randbereich der Scaffolds untersucht. Im zweiten Studienabschnitt war die Auswertung der 8 ROIs im Randbereich der Scaffolds der MALP-2-Gruppe allerdings nicht möglich. Dies war bedingt durch die starke angiogene Reaktion im umliegenden Gewebe der Scaffolds, wodurch es vermehrt zum Austritt von Blut aus den neu entstandenen Gefäßsprossen kam. Diese Einblutungen konnten verstärkt in den Rückenhautkammern der MALP-2-Gruppe (*Abbildung 19 B*) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (*Abbildung 19 A*) detektiert werden. Die Vaskularisierung im Randbereich der Scaffolds und im umliegenden Gewebe wurde im zweiten Studienabschnitt deshalb ausschließlich mittels histologischer und immunhistochemischer Analysen untersucht.



**Abbildung 19.** (A, B) Intravitaler Fluoreszenzmikroskopie (in Blaulicht-Epi-Illumination mit Kontrastverstärkung durch 5 % FITC-markiertes Dextran 150.000) eines nHA/PU-Scaffolds (unterbrochene Linie) 14 Tage nach lokaler Applikation von Vehikel (A) und MALP-2 (B) auf das Gewebe der Rückenhautkammer. Im Gewebe der Rückenhautkammer um das Scaffold zeigen sich in der Kontrollgruppe zahlreiche mit FITC-Dextran-perfundierte Blutgefäße (A, Pfeile), wohingegen in der MALP-2-Gruppe großflächige Einblutungen nicht aber perfundierte Mikrogefäße zu erkennen sind (B, Sternchen). Maßstab: 209 µm.

Zusätzlich konnten mit der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie auch entzündliche Prozesse in der Rückenhautkammer durch Analyse der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion untersucht werden, wobei die Entzündungsreaktion im Gewebe zu einer

Reduktion der Fließgeschwindigkeit der Leukozyten mit anschließender Aktivierung und Adhäsion an die Gefäßwand führte [Langer *et al.*, 2009]. Die Visualisierung der Leukozyten in den Venolen der Rückenhautkammer erfolgte über die intravenöse Gabe von 0.05 ml 0,1 % Rhodamin 6G.

Jede mikroskopische Untersuchung wurde auf DVD aufgezeichnet und im Anschluss mit geeigneter Bildverarbeitungstechnik ausgewertet. So konnte die Mikroskopiezeit verkürzt und die Belastung für die Versuchstiere auf ein Minimum reduziert werden [Intaglietta und Tompkins, 1972]. Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie als nicht invasives Untersuchungsverfahren birgt trotzdem gewisse Risiken für das zu untersuchende Gewebe. Von großer Bedeutung sind phototoxische Effekte, die indirekt durch freie Sauerstoffradikale, welche durch die Anregung der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe entstehen [Penning und Dubbelman, 1994], induziert werden. Auch die direkte Schädigung des Gewebes durch Überwärmung bei einer langen Einwirkungsdauer bzw. einer zu hohen Intensität des Lichts ist möglich. Solche phototoxischen Effekte haben beispielsweise einen Einfluss auf die funktionelle Kapillardichte [Friesenecker *et al.*, 1994] oder die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion [Saetzler *et al.*, 1997]. Um dies zu vermeiden, wurde die tägliche Mikroskopiezeit auf 15 - 20 Minuten pro Versuchstier beschränkt. [Steinbauer *et al.*, 2000]

## 7.2. Diskussion der Ergebnisse

### 7.2.1. Vaskularisierung implantierter Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus adulten und alten Spendermäusen

Die Besiedlung von Scaffolds mit isolierten Gefäßfragmenten aus Spenderfettgewebe ist eine neue, innovative und vielversprechende Methode zur Verbesserung der Vaskularisierung von Scaffolds im Tissue Engineering [Shepherd *et al.*, 2007; Hiscox *et al.*, 2008; Laschke *et al.*, 2012b; Pilia *et al.*, 2014]. So könnte das benötigte Fettgewebe zur Isolierung von Gefäßfragmenten unter klinischen Bedingungen minimal-invasiv mittels Liposuktion ohne größeres operatives Trauma entnommen werden [Sterodimas *et al.*, 2010]. Neben dem Einsatz von Gefäßfragmenten gibt es bereits einige andere Vaskularisierungsstrategien, die auf autolog gewonnenem Zell-

material basieren, wie beispielsweise die Applikation von „platelet-rich plasma“ als Quelle für eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren [Blanton *et al.*, 2009; Lippross *et al.*, 2011; Jalowiec *et al.*, 2016]. Die Qualität des autolog gewonnenen Materials ist dabei teilweise sehr heterogen und gegebenenfalls auch vom Alter des jeweiligen Spenders abhängig. In diesem Zusammenhang konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das regenerative Potential isolierter Gefäßfragmente aus alten im Vergleich zu adulten Fettgewebsspendern signifikant reduziert ist.

Die Angiogenese und das Remodeling der Gefäße, also der strukturelle Umbau der Gefäßwand, sind Prozesse, die an der Ausbildung komplexer Gefäßnetzwerke innerhalb von Gefäßfragment-besiedelten Scaffolds beteiligt sind [Chang *et al.*, 2010; Nunes *et al.*, 2010b]. Aus anderen Bereichen ist bekannt, dass diese Prozesse mit zunehmendem Alter verlangsamt und weniger effektiv ablaufen, was beispielsweise ein Grund für die erhöhte Prävalenz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen bei älteren Patienten ist [Lähteenvuo und Rosenzweig, 2012]. Die genauen Mechanismen, die dabei auf molekularer und zellulärer Ebene ablaufen, sind allerdings noch nicht endgültig geklärt. Je nach Studie wird zudem ein unterschiedlicher Effekt des Alters des Patienten auf die Angiogenese beschrieben. Einerseits soll das Alter des Patienten einen negativen Effekt auf die Angiogenese während der Wundheilung haben [Rivard *et al.*, 1999; Swift *et al.*, 1999], andererseits konnte gezeigt werden, dass das Alter die angiogene Reaktion des Skelettmuskels auf aerobes Training nicht beeinflusst [Rossiter *et al.*, 2005; Gavin *et al.*, 2007]. In dieser Studie wurden verschiedene Mechanismen untersucht, die ursächlich für das schlechtere Vaskularisierungspotential isolierter Gefäßfragmente aus alten Spendermäusen sein könnten.

Hierzu wurden Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus adulten und alten Fettgewebsspendern in die Rückenhautkammern von Empfängertieren implantiert und anschließend mittels repetitiver intravitaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dadurch konnte die Ausreifung der sich neu formierenden Gefäßnetzwerke und die Mikrohämodynamik einzelner Gefäße innerhalb der Scaffolds über einen Zeitraum von 14 Tagen beurteilt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Gefäßdurchmesser in den Gefäßnetzwerken innerhalb der Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus adulten Spendermäusen bei gleichzeitiger Zunahme der Blutzellgeschwindigkeit stetig abnahmen. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Ausreifung von Gefäßnetzwerken durch die Rekrutierung von perivaskulären Zellen und glatten Muskelzellen

charakterisiert ist. Diese Zellen sind für die Kontraktilität und die Stabilisierung der Gefäßwand verantwortlich, was zu einer Reduktion des Gefäßdurchmessers führt [Hellström et al., 2001] und charakteristisch für die Ausreifung von Gefäßen zu funktionsfähigen Netzwerken ist [Menger et al., 1989; Vollmar et al., 2001; Laschke et al., 2006b]. Somit nahm auch die aus dem Durchmesser und der Blutzellgeschwindigkeit berechnete Scherrate in den Gefäßen stetig zu. Es ist bekannt, dass eine erhöhte Scherrate Angiogenese induzieren kann [Brown und Hudlicka, 2003; Resnick et al., 2003]. Dies ist eine mögliche Erklärung für die bessere Vaskularisierung der Scaffolds in der Gruppe der adulten Spendermäuse. Im Gegensatz dazu blieben die Gefäßdurchmesser in den Gefäßnetzwerken innerhalb der Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus alten Spendermäusen bei gleichzeitig reduzierter Blutzellgeschwindigkeit konstant groß. Dies spricht für eine verlangsamte und nicht adäquate Ausreifung der Gefäßnetzwerke.

Weiterhin ist bekannt, dass sich nicht adäquat ausgereifte Gefäßnetzwerke nach einer gewissen Zeit wieder zurückbilden [Papetti und Herman, 2002]. Dazu passt, dass in den Gefäßnetzwerken in den Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus alten Spendermäusen weniger CD31<sup>+</sup>/α-SMA<sup>+</sup> Gefäße detektiert werden konnten als in den Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus adulten Spendermäusen. Zudem wurde auch eine geringere Gefäßdichte im Zentrum und im Randbereich der Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus alten Spendermäusen nachgewiesen.

Um das regenerative Potential isolierter Gefäßfragmente noch detaillierter untersuchen zu können, wurden in einem weiteren Experiment Scaffolds mit isolierten Gefäßfragmenten für 18 Stunden in einer Hypoxiekammer inkubiert. So sollten die hypoxischen Bedingungen in der Rückenhautkammer in den ersten Stunden nach der Implantation der Scaffolds simuliert werden. Es ist bekannt, dass Gefäße unter hypoxischen Bedingungen vermehrt angiogene Wachstumsfaktoren produzieren und freisetzen [Choi et al., 2003], wobei die Freisetzung in alten Patienten weniger stark ausgeprägt ist [Lähteenhuo und Rosenzweig, 2012]. In der vorliegenden Studie konnte allerdings kein Unterschied in der Konzentration von freigesetztem VEGF und bFGF zwischen Gefäßfragmenten aus adulten und alten Spendermäusen festgestellt werden. Im Gegensatz zu anderen Studien [Wang et al., 2004; Wang et al., 2014] unterschied sich auch nicht die Anzahl apoptotischer und proliferierender Zellen in den isolierten Gefäßen beider Gruppen. Das schlechtere Vaskularisierungspotential der Gefäßfragmente aus alten Spendermäusen kann

somit nicht primär durch eine geringere Ausschüttung von angiogenen Wachstumsfaktoren oder eine reduzierte proliferative Aktivität oder Viabilität der Zellen erklärt werden.

Neben Endothelzellen und perivaskulären Zellen enthalten isolierte Gefäßfragmente auch MSCs und EPCs [Laschke *et al.*, 2012b; McDaniel *et al.*, 2014]. Der Stammzellgehalt isolierter Gefäßfragmente aus adulten und alten Spendermäusen wurde mit durchflusszytometrischen Analysen bestimmt. Es konnte dabei kein Unterschied in der Anzahl CD73<sup>+</sup> und CD117<sup>+</sup> MSCs oder Sca-1<sup>+</sup>/VEGF-2<sup>+</sup> EPCs zwischen beiden Gruppen festgestellt werden. Dies bedeutet wiederum nicht, dass auch das regenerative Potenzial der Stammzellen in beiden Gruppen identisch war. Vielmehr hat das fortschreitende Alter eines Fettgewebsspenders einen negativen Einfluss auf die Proliferation, Differenzierung und angiogene Aktivität isolierter MSCs [Alt *et al.*, 2012; Efimenko *et al.*, 2014].

Zusätzlich wurde auch die Expression von MMP-9 in den Gefäßfragmenten analysiert. MMP-9 ist an der Auflösung der extrazellulären Matrix und der Rekrutierung von Perizyten im Rahmen angiogener Prozesse beteiligt [Chantrain *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2013]. Interessanterweise konnte in den Gefäßfragmenten adulter Spendermäuse eine starke Expression von MMP-9 in den perivaskulären Zellen nachgewiesen werden. In den perivaskulären Zellen der Gefäßfragmente alter Spendermäuse wurde dagegen nur eine sehr geringe Expression von MMP-9 beobachtet. Diese Ergebnisse sind eine weitere mögliche Erklärung für die schlechtere Vaskularisierung der Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus alten Spendermäusen. So konnte Cheng *et al.* (2011) zeigen, dass neu entstandene Gefäßnetzwerke durch den Mechanismus des „wrapping-and-tapping“ mit dem körpereigenen Gefäßsystem anastomosieren und dadurch perfundiert werden. Hierbei legt sich das neue Gefäß um das bereits perfundierte Gefäß („wrapping“) und setzt hohe Konzentrationen von MMP-9 frei, wodurch die Gefäßwand des darunterliegenden Gefäßes aufgelöst wird („tapping“). Durch die niedrige Expression von MMP-9 in den Gefäßnetzwerken der Scaffolds mit Gefäßfragmenten aus alten Spendermäusen konnten daher möglicherweise die Gefäßfragmente schlechter mit dem Gefäßsystem des Empfängergewebes anastomosieren.

Zusammenfassend konnte in diesem Studienabschnitt gezeigt werden, dass mit zunehmendem Alter der Fettgewebsspender das Vaskularisierungspotential isolierter Gefäßfragmente und deren Fähigkeit, sich zu adäquaten Gefäßnetzwerken

zusammenzuschließen, deutlich reduziert ist. Da aufgrund des demographischen Wandels zukünftig vermehrt ältere Patienten auf das Tissue Engineering angewiesen sein werden, sollten neue Methoden etabliert werden, die das Vaskularisierungspotential von Gefäßfragmenten auch im höheren Alter erhalten bzw. optimieren.

### **7.2.1. Vaskularisierung implantierter Scaffolds nach lokaler Applikation von MALP-2**

In einem zweiten Studienabschnitt wurde der Effekt von MALP-2 auf die Vaskularisierung von Gefäßfragment-besiedelten nHA/PU-Scaffolds untersucht. Die isolierten Gefäßfragmente schließen sich nach der Implantation zu neuen Gefäßnetzwerken zusammen und verbessern dadurch die Vaskularisierung der Scaffolds [Laschke *et al.*, 2012b; 2014b]. Es dauert jedoch einige Tage, bis die ersten Gefäße in den Scaffolds perfundiert werden, wobei die Zellen innerhalb der Scaffolds insbesondere in dieser Phase hypoxischen Bedingungen ausgesetzt sind. Da bereits gezeigt wurde, dass die frühe Vaskularisierung und Inkorporation unbesiedelter (Medpor<sup>®</sup>) Scaffolds durch die lokale Applikation des pro-angiogenen MALP-2 beschleunigt und verbessert werden kann [Laschke *et al.*, 2014a], wurde in diesem Studienabschnitt die Hypothese überprüft, ob die lokale Applikation von MALP-2 auch die Vaskularisierung Gefäßfragment-besiedelter Scaffolds fördert. Dabei zeigte sich, dass lediglich im Randbereich der Scaffolds die Vaskularisierung verbessert werden konnte. Überraschenderweise wurde die Bildung neuer Gefäßnetzwerke aus den isolierten Gefäßfragmenten im Zentrum der Scaffolds durch die lokale Applikation von MALP-2 gehemmt.

MALP-2 ist ein potenter Stimulator der Immunreaktion [Grote *et al.*, 2010]. Daher wurde zunächst die leukozytäre Entzündungsreaktion im Gewebe der Rückenhautkammer nach Applikation von MALP-2 bzw. Vehikel mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Bei den untersuchten Venolen konnte kein Unterschied im Gefäßdurchmesser, der Blutzellgeschwindigkeit und der Scherrate festgestellt werden. Somit kann die unterschiedlich ausgeprägte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion nach Applikation von MALP-2 bzw. Vehikel nicht auf unterschiedliche mikrohämodynamische Bedingungen in den untersuchten Gefäßen zurückgeführt werden. Wie bereits in früheren Studien gezeigt werden konnte [Laschke *et al.*, 2014a], führte die lokale Applikation von MALP-2 auch in dieser Studie innerhalb der



ersten Tage zu einer starken Entzündungsreaktion im Gewebe der Rückenhautkammer. Diese temporäre Entzündungsreaktion trug möglicherweise entscheidend zur verbesserten Vaskularisierung im Randbereich der Scaffolds bei. So führt die Akkumulation von Leukozyten zu einer vermehrten Freisetzung angiogener Wachstumsfaktoren und folglich auch zu einer gesteigerten Gefäßneubildung [David Dong et al., 2009; Kreuger und Phillipson, 2016].

Durch die Besiedlung von Scaffolds mit GFP<sup>+</sup> Gefäßfragmenten konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass die neuen Gefäßnetzwerke innerhalb der Scaffolds primär aus dem Zusammenschluss der isolierten Gefäßfragmente mittels Angiogenese resultieren, die anschließend durch die Anastomosierung mit der Mikrozirkulation des umliegenden Gewebes perfundiert werden [Laschke et al., 2012b]. Die Angiogenese im Zentrum der Scaffolds wurde in der vorliegenden Studie allerdings durch die lokale Applikation von MALP-2 trotz der bekannten pro-angiogenen Eigenschaften nicht gefördert. Die Scaffolds wurden im Zentrum schlechter perfundiert und hatten eine geringere funktionelle Kapillardichte als die Scaffolds der Kontrolle. Histologisch konnte auch weniger eingewachsenes Granulationsgewebe im Zentrum der Scaffolds der MALP-2-Gruppe nachgewiesen werden. Zudem waren die neugebildeten Gefäßnetzwerke in den Scaffolds dieser Gruppe auch schlechter ausgereift. Aufgrund der größeren Gefäßdurchmesser und reduzierten Blutzellgeschwindigkeit, war auch die aus diesen Parametern berechnete Scherrate in den Gefäßen der MALP-2-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle signifikant erniedrigt.

30 Minuten nach der lokalen Applikation von MALP-2 erfolgte die Implantation der Gefäßfragment-besiedelten Scaffolds in die Rückenhautkammer, wobei die Suspension aus MALP-2 und Vehikel nach dieser Zeit noch nicht vollständig vom Gewebe resorbiert worden war. Dadurch wurden die Gefäßfragmente direkt MALP-2 exponiert. Um eine Erklärung für das reduzierte angiogene Potential isolierter Gefäßfragmente nach MALP-2 Applikation zu finden, wurden in einem zusätzlichen in vitro Experiment isolierte Gefäßfragmente für 24 Stunden in EC-Medium mit MALP-2 bzw. Vehikel inkubiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass Gefäßfragmente, die mit MALP-2 inkubiert wurden, eine signifikant höhere Anzahl apoptotischer Endothelzellen und perivaskulärer Zellen enthalten als die Gefäßfragmente der Vehikel-behandelten Kontrolle. Into et al. zeigten bereits 2004, dass nuclear factor (NF)-κB in kultivierten HEK293 Zellen nach der Applikation von MALP-2 vermehrt stimuliert und

aktiviert wird. Die Aktivierung der mitogen activated protein kinase (MAPK) durch p38 führt schließlich zur Apoptose der Zellen. Dieser apoptotische Effekt von MALP-2 und das damit verbundene reduzierte Vaskularisierungspotential isolierter Gefäßfragmente ist somit eine mögliche Erklärung für die schlechtere Vaskularisierung der Scaffolds der MALP-2-Gruppe. Allerdings kann aus der guten Vaskularisierung und hohen Dichte des Granulationsgewebes im Randbereich der Scaffolds der MALP-2-Gruppe geschlussfolgert werden, dass MALP-2 in den Gefäßen des Empfängerorgans keine relevante Apoptose induzierte. Die unterschiedlichen Effekte von MALP-2 auf die intakte Mikrozirkulation der Rückenhautkammer und die isolierten Gefäßfragmente kann möglicherweise auf die zusätzliche Belastung der Gefäßfragmente durch die Isolierung mittels enzymatischer Digestion und mechanischer Zerkleinerung zurückgeführt werden. Zudem sind die isolierten Gefäßfragmente im Gegensatz zu den perfundierten, intakten Gefäßen des Empfängerorgans direkt nach Implantation der Scaffolds hypoxischen Bedingungen ausgesetzt, was zu einer zusätzlichen Schädigung führen kann. Weiterhin sind zur Aufrechterhaltung des physiologischen Milieus in Gefäßen, welches die Funktionalität ihrer Endothelzellen sicherstellt, der Blutfluss und die dadurch entstehenden Scherkräfte essentiell [Chien, 2007; Weber *et al.*, 2010]. So ist bekannt, dass die Unterbrechung des Blutflusses in einem Gefäß zur Apoptose von Endothelzellen führt [Meeson *et al.*, 1996].

Es kann somit geschlussfolgert werden, dass trotz der pro-angiogenen Wirkung von MALP-2 das Vaskularisierungspotential der isolierten Gefäßfragmente im Zentrum von Scaffolds wesentlich verschlechtert wird.

### **7.3. Schlussfolgerung und klinische Perspektiven**

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass Scaffolds mit isolierten Gefäßfragmenten aus alten Spendermäusen im Vergleich zu Scaffolds mit isolierten Gefäßfragmenten aus adulten Spendermäusen schlechter vaskularisieren. Da zukünftig vermehrt ältere Patienten auf neue Behandlungsmethoden des Tissue Engineerings angewiesen sein werden, müssen neue Strategien entwickelt werden, um die hervorragenden angiogenen Eigenschaften isolierter Gefäßfragmente auch bei älteren Patienten nutzen zu können. Möglicherweise könnte hierzu den Patienten

Fettgewebe bereits während anderer Operationen im frühen Erwachsenenalter entnommen und mittels Kryokonservierung für die spätere Isolierung von Gefäßfragmenten konserviert werden. Ein solcher Ansatz wird heute bereits für Stammzelltherapien vorgeschlagen [*Shivakumar et al.*, 2016].

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine lokale Applikation von MALP-2 die angiogene Reaktion des Kammergewebes auf implantierte Scaffolds fördert. Allerdings führt MALP-2 gleichzeitig zu einer Reduktion des angiogenen Potentials isolierter Gefäßfragmente und somit zu einer schlechteren Vaskularisierung im Inneren von Gefäßfragment-besiedelten Scaffolds. In weiteren Studien sollte daher untersucht werden, ob durch Schutz der Gefäßfragmente vor der direkten Einwirkung von MALP-2, das Vaskularisierungsergebnis verbessert werden kann. Dies könnte beispielsweise durch eine längere Latenzphase zwischen MALP-2 Applikation und Implantation der Scaffolds oder durch die Reduktion des applizierten Volumens, was zu einer schnelleren Resorption führt, erzielt werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die lokale Applikation anderer pro-angiogener Substanzen. Ein vielversprechender Kandidat könnte "platelet rich plasma" sein. Dies steht als autologes Spendermaterial zu Verfügung und kann aus dem Blut eines Patienten einfach und schnell gewonnen werden. Weiterhin enthält es zahlreiche pro-angiogene Faktoren, die beispielsweise die Wundheilung wesentlich verbessern [*Park et al.*, 2017; *Jalowiec et al.*, 2016].

## 8. Literaturverzeichnis

1. **Agrawal CM, Ray RB** (2001) Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 55: 141-50.
2. **Algire GH** (1943) An adaption of the transparent chamber technique to the mouse. *J Natl Cancer Inst* 4: 1-11.
3. **Alt EU, Senst C, Murthy SN, Slakey DP, Dupin CL, Chaffin AE, Kadowitz PJ, Izadpanah R** (2012) Aging alters tissue resident mesenchymal stem cell properties. *Stem Cell Res* 8: 215-25.
4. **Auger FA, Gibot L, Lacroix D** (2013) The pivotal role of vascularization in tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng* 15: 177-200.
5. **Baatz H, Steinbauer M, Harris AG, Krombach F** (1995) Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G. *Int J Microcirc Clin Exp* 15: 85-91.
6. **Blanton MW, Hadad I, Johnstone BH, Mund JA, Rogers PI, Eppley BL, March KL** (2009) Adipose stromal cells and platelet-rich plasma therapies synergistically increase revascularization during wound healing. *Plast Reconstr Surg* 123: 56S-64S.
7. **Boissard CI, Bourban PE, Tami AE, Alini M, Eglin D** (2009) Nanohydroxyapatite/poly(ester urethane) scaffold for bone tissue engineering. *Acta Biomater* 5: 3316-27.
8. **Bose S, Tarafder S** (2012) Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review. *Acta Biomater* 8: 1401-21.
9. **Brown MD, Hudlicka O** (2003) Modulation of physiological angiogenesis in skeletal muscle by mechanical forces: involvement of VEGF and metalloproteinases. *Angiogenesis* 6: 1-14.
10. **Butler MJ, Sefton MV** (2007) Poly(butyl methacrylate-co-methacrylic acid) tissue engineering scaffold with pro-angiogenic potential in vivo. *J Biomed Mater Res A* 82: 265-73.

11. **Carmeliet P** (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6: 389-95.
12. **Cataldi A, Yevsa T, Vilte DA, Schulze K, Castro-Parodi M, Larzábal M, Ibarra C, Mercado EC, Guzmán CA** (2008) Efficient immune responses against Intimin and EspB of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* after intranasal vaccination using the TLR2/6 agonist MALP-2 as adjuvant. *Vaccine* 26: 5662-7.
13. **Chan BP, Leong KW** (2008) Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J* 4: 467-79.
14. **Chang CC, Nunes SS, Sibole SC, Krishnan L, Williams SK, Weiss JA, Hoying JB** (2010) Angiogenesis in a microvascular construct for transplantation depends on the method of chamber circulation. *Tissue Eng Part A* 16: 795-805.
15. **Chantrain CF, Henriot P, Jodele S, Emonard H, Feron O, Courtoy PJ, DeClerck YA, Marbaix E** (2006) Mechanisms of pericyte recruitment in tumour angiogenesis: a new role for metalloproteinases. *Eur J Cancer* 42: 310-8.
16. **Chen Q, Jin M, Yang F, Zhu J, Xiao Q, Zhang L** (2013) Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling. *Mediators Inflamm* 2013: 928315.
17. **Cheng G, Liao S, Kit Wong H, Lacorre DA, di Tomaso E, Au P, Fukumura D, Jain RK, Munn LL** (2011) Engineered blood vessel networks connect to host vasculature via wrapping-and-tapping anastomosis. *Blood* 118: 4740-9.
18. **Chien S** (2007) Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H1209-24.
19. **Choi KS, Bae MK, Jeong JW, Moon HE, Kim KW** (2003) Hypoxia-induced angiogenesis during carcinogenesis. *J Biochem Mol Biol* 36: 120-7.
20. **Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J, Harris DT** (2014) Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J Transl Med* 12: 8.
21. **Cole M, Cox S, Inman E, Chan C, Mana M, Helgersson S, Tawil B** (2007) Fibrin as a delivery vehicle for active macrophage activator lipoprotein-2 peptide: in vitro studies. *Wound Repair Regen* 15: 521-9.

22. **Colton CK** (1995) Implantable biohybrid artificial organs. *Cell Transplant* 4: 415-36.
23. **Daoud JT, Petropavlovskaia MS, Patapas JM, Degrandpré CE, Diraddo RW, Rosenberg L, Tabrizian M** (2011) Long-term in vitro human pancreatic islet culture using three-dimensional microfabricated scaffolds. *Biomaterials* 32:1536-42.
24. **David Dong ZM, Aplin AC, Nicosia RF** (2009) Regulation of angiogenesis by macrophages, dendritic cells, and circulating myelomonocytic cells. *Curr Pharm Des* 15: 365-79.
25. **Debergh I, Pattyn P, Ceelen W** (2015) Microvascular effects of the low molecular weight heparins in a colorectal xenograft model: an intravital microscopy study. *J Surg Res* 194: 488-95.
26. **Deiters U, Barsig J, Tawil B, Mühlradt PF** (2004) The macrophage-activating lipopeptide-2 accelerates wound healing in diabetic mice. *Exp Dermatol* 13: 731-9.
27. **Dong JD, Huang JH, Gao F, Zhu ZH, Zhang J** (2011) Mesenchymal stem cell-based tissue engineering of small-diameter blood vessels. *Vascular* 19: 206-13.
28. **Druecke D, Langer S, Lamme E, Pieper J, Ugarkovic M, Steinau HU, Homann HH** (2004) Neovascularization of poly(ether ester) block-copolymer scaffolds in vivo: long-term investigations using intravital fluorescent microscopy. *J Biomed Mater Res A* 68: 10-8.
29. **Ducheyne P, Qiu Q** (1999) Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials* 20: 2287-303.
30. **Efimenko A, Dzhoyashvili N, Kalinina N, Kochegura T, Akchurin R, Tkachuk V, Parfyonova Y** (2014) Adipose-derived mesenchymal stromal cells from aged patients with coronary artery disease keep mesenchymal stromal cell properties but exhibit characteristics of aging and have impaired angiogenic potential. *Stem Cells Transl Med* 3: 32-41.
31. **Folkman J, Hochberg M** (1973) Self-regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med* 138: 745-53.
32. **Freyman TM, Yannas IV, Yokoo R, Gibson LJ** (2001) Fibroblast contraction of a collagen-GAG matrix. *Biomaterials* 22: 2883-91.

33. **Friesenecker B, Tsai AG, Intaglietta M** (1994) Capillary perfusion during ischemia-reperfusion in subcutaneous connective tissue and skin muscle. *Am J Physiol* 267: H2204-12.
34. **Frueh FS, Später T, Lindenblatt N, Calcagni M, Giovanoli P, Scheuer C, Menger MD, Laschke MW** (2017) Adipose Tissue-Derived Microvascular Fragments Improve Vascularization, Lymphangiogenesis, and Integration of Dermal Skin Substitutes. *J Invest Dermatol* 137: 217-27.
35. **Gavin TP, Ruster RS, Carrithers JA, Zwetsloot KA, Kraus RM, Evans CA, Knapp DJ, Drew JL, McCartney JS, Garry JP, Hickner RC** (2007) No difference in the skeletal muscle angiogenic response to aerobic exercise training between young and aged men. *J Physiol* 585: 231-39.
36. **Ghasemi-Mobarakeh L, Prabhakaran MP, Tian L, Shamirzaei-Jeshvaghani E, Dehghani 1, Ramakrishna S** (2015) Structural properties of scaffolds: Crucial parameters towards stem cells differentiation. *World J Stem Cells* 7: 728-44.
37. **Gorna K, Gogolewski S** (2006) Biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue repair and regeneration. *J Biomed Mater Res A* 79: 128-38.
38. **Griffin MF, Palgrave RG, Seifalian AM, Butler PE, Kalaskar DM** (2016) Enhancing tissue integration and angiogenesis of a novel nanocomposite polymer using plasma surface polymerisation, an in vitro and in vivo study. *Biomater Sci* 4: 145-58.
39. **Grote K, Schuett H, Salguero G, Grothusen C, Jagielska J, Drexler H, Mühlradt PF, Schieffer B** (2010) Toll-like receptor 2/6 stimulation promotes angiogenesis via GM-CSF as a potential strategy for immune defense and tissue regeneration. *Blood* 115: 2543-52.
40. **Grote K, Sonnenschein K, Kapopara PR, Hillmer A, Grothusen C, Salguero G, Kotlarz D, Schuett H, Bavendiek U, Schieffer B** (2013a) Toll-like receptor 2/6 agonist macrophage-activating lipopeptide-2 promotes reendothelialization and inhibits neointima formation after vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33: 2097-104.
41. **Grote K, Petri M, Liu C, Jehn P, Spalthoff S, Kokemüller H, Luchtefeld M, Tschernig T, Krettek C, Haasper C, Jagodzinski M** (2013b) Toll-like receptor 2/6-dependent stimulation of mesenchymal stem cells promotes angiogenesis by paracrine factors. *Eur Cell Mater* 26: 66-79.

42. **Grässer C, Scheuer C, Parakenings J, Tschernig T, Eglin D, Menger MD, Laschke MW** (2016) Effects of macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) on the vascularisation of implanted polyurethane scaffolds seeded with microvascular fragments. *Eur Cell Mater* 32: 74-86.
43. **Harris AG, Leiderer R, Peer F, Messmer K** (1996) Skeletal muscle microvascular and tissue injury after varying durations of ischemia. *Am J Physiol*. 271: H2388-98.
44. **Harris AG, Steinbauer M, Leiderer R, Messmer K** (1997) Role of leukocyte plugging and edema in skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 273: H989-96.
45. **Hellström M, Gerhardt H, Kalén M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, Betsholtz C** (2001) Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol* 153: 543-53.
46. **Herr N, Mauler M, Bode C, Duerschmied D** (2015) Intravital microscopy of leukocyte-endothelial and platelet-leukocyte interactions in mesenteric veins in mice. *J Vis Exp* 13: 53077.
47. **Hiscox AM, Stone AL, Limesand S, Hoying JB, Williams SK** (2008) An islet-stabilizing implant constructed using a preformed vasculature. *Tissue Eng* 14: 433-40.
48. **Hoffmann JN, Vollmar B, Laschke MW, Inthorn D, Fertmann J, Schildberg FW, Menger MD** (2004) Microhemodynamic and cellular mechanisms of activated protein C action during endotoxemia. *Crit Care Med* 32: 1011-7.
49. **Holland TA, Bodde EW, Baggett LS, Tabata Y, Mikos AG, Jansen JA** (2005) Osteochondral repair in the rabbit model utilizing bilayered, degradable oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogel scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 75: 156-67.
50. **Hoying JB, Boswell CA, Williams SK** (1996) Angiogenic potential of microvessel fragments established in three-dimensional collagen gels. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 32: 409-19.
51. **Intaglietta M, Tompkins WR** (1972) On-line measurement of microvascular dimensions by television microscopy. *J Appl Physiol* 32: 546-51.
52. **Into T, Kiura K, Yasuda M, Kataoka H, Inoue N, Hasebe A, Takeda K, Akira S, Shibata K** (2004) Stimulation of human Toll-like receptor (TLR) 2 and



- TLR6 with membrane lipoproteins of *Mycoplasma fermentans* induces apoptotic cell death after NF-kappa B activation. *Cell Microbiol* 6: 187-99.
53. **Jalowiec JM, D'Este M, Bara JJ, Denom J, Menzel U, Alini M, Verrier S, Herrmann M** (2016) An in vitro investigation of platelet-rich plasma-gel as a cell and growth factor delivery vehicle for tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods* 22: 49-58.
  54. **Johnson EO, Troupis T, Soucacos PN** (2011) Tissue-engineered vascularized bone grafts: basic science and clinical relevance to trauma and reconstructive microsurgery. *Microsurgery* 31: 176-82.
  55. **Johnson TD, Christman KL** (2013) Injectable hydrogel therapies and their delivery strategies for treating myocardial infarction. *Expert Opin Drug Deliv* 10: 59-72.
  56. **Kerber-Momot T, Leemhuis D, Lührmann A, Munder A, Tümmler B, Pabst R, Tschernig T** (2010) Beneficial effects of TLR-2/6 ligation in pulmonary bacterial infection and immunization with *Pseudomonas aeruginosa*. *Inflammation* 33: 58-64.
  57. **Klyscz T, Jünger M, Jung F, Zeintl H** (1997) Cap image - a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed Tech (Berl)* 42: 168-75.
  58. **Koike N, Fukumura D, Gralla O, Au P, Schechner JS, Jain RK** (2004) Tissue engineering: creation of long-lasting blood vessels. *Nature* 428: 138-9.
  59. **Kokemueller H, Spalthoff S, Nolff M, Tavassol F, Essig H, Stuehmer C, Bormann KH, Rücker M, Gellrich NC** (2010) Prefabrication of vascularized bioartificial bone grafts in vivo for segmental mandibular reconstruction: experimental pilot study in sheep and first clinical application. *Int J Oral Maxillofac Surg* 39: 379-87.
  60. **Kremer T, Abé D, Weihrauch M, Peters C, Gebhardt MM, Germann G, Heitmann C, Walther A** (2008) Burn plasma transfer induces burn edema in healthy rats. *Shock* 30: 394-400.
  61. **Kreuger J, Phillipson M** (2016) Targeting vascular and leukocyte communication in angiogenesis, inflammation and fibrosis. *Nat Rev Drug Discov* 15: 125-42.
  62. **Krishnan L, Willett NJ, Guldborg RE** (2014) Vascularization strategies for bone regeneration. *Ann Biomed Eng* 42: 432-44.

63. **Lähteenpää J, Rosenzweig A** (2012) Effects of aging on angiogenesis. *Circ Res* 110: 1252-64.
64. **Langer R, Vacanti JP** (1993) Tissue engineering. *Science* 260: 920-6.
65. **Langer HF, Chavakis T** (2009) Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. *J Cell Mol Med* 13: 1211-20.
66. **Laschke MW, Häufel JM, Thorlacius H, Menger MD** (2005) New experimental approach to study host tissue response to surgical mesh materials in vivo. *J Biomed Mater Res A* 74: 696-704.
67. **Laschke MW, Harder Y, Amon M, Martin I, Farhadi J, Ring A, Torio-Padron N, Schramm R, Rücker M, Junker D, Häufel JM, Carvalho C, Heberer M, Germann G, Vollmar B, Menger MD** (2006a) Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng* 12: 2093-104.
68. **Laschke MW, Elitzsch A, Vollmar B, Vajkoczy P, Menger MD** (2006b) Combined inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor, but not inhibition of VEGF alone, effectively suppresses angiogenesis and vessel maturation in endometriotic lesions. *Hum Reprod* 21: 262-8.
69. **Laschke MW, Rücker M, Jensen G, Carvalho C, Mülhaupt R, Gellrich NC, Menger MD** (2008) Improvement of vascularization of PLGA scaffolds by inosculation of in situ-preformed functional blood vessels with the host microvasculature. *Ann Surg* 248: 939-48.
70. **Laschke MW, Vollmar B, Menger MD** (2009a) Inosculation: connecting the life-sustaining pipelines. *Tissue Eng Part B Rev* 15: 455-65.
71. **Laschke MW, Strohe A, Scheuer C, Eglin D, Verrier S, Alini M, Pohlemann T, Menger MD** (2009b) In vivo biocompatibility and vascularization of biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue engineering. *Acta Biomater* 5: 1991-2001.
72. **Laschke MW, Mussawy H, Schuler S, Eglin D, Alini M, Menger MD** (2010a) Promoting external inosculation of prevascularised tissue constructs by pre-cultivation in an angiogenic extracellular matrix. *Eur Cell Mater* 20: 356-66.
73. **Laschke MW, Strohe A, Menger MD, Alini M, Eglin D** (2010b) In vitro and in vivo evaluation of a novel nanosize hydroxyapatite particles/poly(ester-

- urethane) composite scaffold for bone tissue engineering. *Acta Biomater* 6: 2020-7.
74. **Laschke MW, Mussawy H, Schuler S, Kazakov A, Rücker M, Eglin D, Alini M, Menger MD** (2011) Short-term cultivation of in situ prevascularized tissue constructs accelerates inosculation of their preformed microvascular networks after implantation into the host tissue. *Tissue Eng Part A* 17: 841-53.
  75. **Laschke MW, Menger MD** (2012a) Vascularization in tissue engineering: angiogenesis versus inosculation. *Eur Surg Res* 48: 85-92.
  76. **Laschke MW, Kleer S, Scheuer C, Schuler S, Garcia P, Eglin D, Alini M, Menger MD** (2012b) Vascularisation of porous scaffolds is improved by incorporation of adipose tissue-derived microvascular fragments. *Eur Cell Mater* 24: 266-77.
  77. **Laschke MW, Augustin V, Kleer S, Tschernig T, Menger MD** (2014a) Locally applied macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) promotes early vascularization of implanted porous polyethylene (Medpor®). *Acta Biomater* 10: 4661-9.
  78. **Laschke MW, Grässer C, Kleer S, Scheuer C, Eglin D, Alini M, Menger MD** (2014b) Adipose tissue-derived microvascular fragments from aged donors exhibit an impaired vascularisation capacity. *Eur Cell Mater* 28: 287-98.
  79. **Laschke MW, Kleer S, Scheuer C, Eglin D, Alini M, Menger MD** (2015) Pre-cultivation of adipose tissue-derived microvascular fragments in porous scaffolds does not improve their in vivo vascularisation potential. *Eur Cell Mater* 29: 190-200.
  80. **Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K** (1993) Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol* 143: 1055-62.
  81. **Lippross S, Loibl M, Hoppe S, Meury T, Benneker L, Alini M, Verrier S** (2011) Platelet released growth factors boost expansion of bone marrow derived CD34(+) and CD133(+) endothelial progenitor cells for autologous grafting. *Platelets* 22: 422-32.
  82. **Mao A, Mooneya D** (2015) Regenerative medicine: Current therapies and future directions. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: 14452-9.
  83. **Marijnissen WJ, van Osch GJ, Aigner J, van der Veen SW, Hollander AP, Verwoerd-Verhoef HL, Verhaar JA** (2002) Alginate as a chondrocyte-

- delivery substance in combination with a non-woven scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 23: 1511-7.
84. **Martin DC, Semple JL, Sefton MV** (2010) Poly(methacrylic acid-co-methyl methacrylate) beads promote vascularization and wound repair in diabetic mice. *J Biomed Mater Res A* 93: 484-92.
  85. **Mastrogiacomo M, Muraglia A, Komlev V, Peyrin F, Rustichelli F, Crovace A, Cancedda R** (2005) Tissue engineering of bone: search for a better scaffold. *Orthod Craniofac Res* 8: 277-84.
  86. **McDaniel JS, Pilia M, Ward CL, Pollot BE, Rathbone CR** (2014) Characterization and multilineage potential of cells derived from isolated microvascular fragments. *J Surg Res* 19: 214-22.
  87. **Meeson A, Palmer M, Calton M, Lang R** (1996) A relationship between apoptosis and flow during programmed capillary regression is revealed by vital analysis. *Development* 122: 3929-38.
  88. **Mehdizadeh H, Bayrak ES, Lu C, Somo SI, Akar B, Brey EM, Cinar A** (2015) Agent-based modeling of porous scaffold degradation and vascularization: Optimal scaffold design based on architecture and degradation dynamics. *Acta Biomater* 27: 167-78.
  89. **Menger MD, Jaeger S, Walter P, Feifel G, Hammersen F, Messmer K** (1989) Angiogenesis and hemodynamics of microvasculature of transplanted islets of Langerhans. *Diabetes* 38 (suppl 1): 199-201.
  90. **Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K** (1992) Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". *Am J Physiol* 263: H1901-6.
  91. **Menger MD, Lehr HA** (1993) Scope and perspectives of intravital microscopy-bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol Today* 14: 519-22.
  92. **Mühlradt PF, Kiess M, Meyer H, Süssmuth R, Jung G** (1997) Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration. *J Exp Med* 185: 1951-8.
  93. **Niebuhr M, Mühlradt PF, Wittmann M, Kapp A, Werfel T** (2008) Intracutaneous injection of the macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) which accelerates wound healing in mice - a phase I trial in 12 patients. *Exp Dermatol* 17: 1052-6.

94. **Nillesen ST, Geutjes PJ, Wismans R, Schalkwijk J, Daamen WF, van Kuppevelt TH** (2007) Increased angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagen-heparin scaffolds containing both FGF2 and VEGF. *Biomaterials* 28: 1123-31.
95. **Novosel EC, Kleinhans C, Kluger PJ** (2011) Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 63: 300-11.
96. **Nunes SS, Greer KA, Stiening CM, Chen HY, Kidd KR, Schwartz MA, Sullivan CJ, Rekapally H, Hoying JB** (2010a) Implanted microvessels progress through distinct neovascularization phenotypes. *Microvasc Res* 79: 10-20.
97. **Nunes SS, Krishnan L, Gerard CS, Dale JR, Maddie MA, Benton RL, Hoying JB** (2010b) Angiogenic potential of microvessel fragments is independent of the tissue of origin and can be influenced by the cellular composition of the implants. *Microcirculation* 17: 557-67.
98. **Oberringer M, Jennewein M, Motsch SE, Pohlemann T, Seekamp A** (2005) Different cell cycle responses of wound healing protagonists to transient in vitro hypoxia. *Histochem Cell Biol* 123: 595-603.
99. **Orr AW, Elzie CA, Kucik DF, Murphy-Ullrich JE** (2003) Thrombospondin signaling through the calreticulin/LDL receptor-related protein co-complex stimulates random and directed cell migration. *J Cell Sci* 116: 2917-27.
100. **Papetti M, Herman IM** (2002) Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C947-70.
101. **Park YG, Lee IH, Park ES, Kim JY** (2017) Hydrogel and platelet-rich plasma combined treatment to accelerate wound healing in a nude mouse model. *Arch Plast Surg* 44: 194-201.
102. **Patan S** (2004) Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat Res* 117: 3-32.
103. **Penning LC, Dubbelman TM** (1994) Fundamentals of photodynamic therapy: cellular and biochemical aspects. *Anticancer Drugs* 5: 139-46.
104. **Pilia M, McDaniel JS, Guda T, Chen XK, Rhoads RP, Allen RE, Corona BT, Rathbone CR** (2014) Transplantation and perfusion of microvascular fragments in a rodent model of volumetric muscle loss injury. *Eur Cell Mater* 28: 11-23.

105. **Purins K, Enblad P, Sandhagen B, Lewén A** (2010) Brain tissue oxygen monitoring: a study of in vitro accuracy and stability of Neurovent-PTO and Licox sensors. *Acta Neurochir* 152: 681-8.
106. **Rharbaoui F, Drabner B, Borsutzky S, Winckler U, Morr M, Ensoli B, Mühlradt PF, Guzmán CA** (2002) The *Mycoplasma-derived* lipopeptide MALP-2 is a potent mucosal adjuvant. *Eur J Immunol* 32: 2857-65.
107. **Ren LL, Ma DY, Feng X, Mao TQ, Liu YP, Ding Y** (2008) A novel strategy for prefabrication of large and axially vascularized tissue engineered bone by using an arteriovenous loop. *Med Hypotheses* 71: 737-40.
108. **Resnick N, Yahav H, Shay-Salit A, Shushy M, Schubert S, Zilberman LC, Wofovitz E** (2003) Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse. *Prog Biophys Mol Biol* 81: 177-99.
109. **Risau W** (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-4.
110. **Rivard A, Fabre JE, Silver M, Chen D, Murohara T, Kearney M, Magner M, Asahara T, Isner JM** (1999) Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation* 99: 111-20.
111. **Rossiter HB, Howlett RA, Holcombe HH, Entin PL, Wagner HE, Wagner PD** (2005) Age is no barrier to muscle structural, biochemical and angiogenic adaptations to training up to 24 months in female rats. *J Physiol* 565: 993-1005.
112. **Rouwkema J, Khademhosseini A** (2016) Vascularization and angiogenesis in tissue engineering: beyond creating static networks. *Trends Biotechnol* 34: 733-45.
113. **Rücker M, Laschke MW, Junker D, Carvalho C, Schramm A, Mülhaupt R, Gellrich NC, Menger MD** (2006) Angiogenic and inflammatory response to biodegradable scaffolds in dorsal skinfold chambers of mice. *Biomaterials* 27: 5027-38.
114. **Rücker M, Laschke MW, Junker D, Carvalho C, Tavassol F, Mülhaupt R, Gellrich NC, Menger MD** (2008) Vascularization and biocompatibility of scaffolds consisting of different calcium phosphate compounds. *J Biomed Mater Res A* 86: 1002-11.
115. **Saetzler RK, Jallo J, Lehr HA, Philips CM, Vasthare U, Arfors KE, Tuma RF** (1997) Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced

- phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem* 45: 505-13.
116. **Sandison JC** (1928) The transparent chamber of the rabbit's ear, giving a complete description of improved technic of construction and introduction, and general account of growth and behavior of living cells and tissues as seen with the microscope. *Am J Anat* 41: 447-72.
  117. **Santos MI, Reis RL** (2010) Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges. *Macromol Biosci* 10: 12-27.
  118. **Schneider C, Schmidt T, Ziske C, Tiemann K, Lee KM, Uhlinsky V, Behrens P, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG, Mühlradt PF, Schmidt J, Märten A** (2004) Tumour suppression induced by the macrophage activating lipopeptide MALP-2 in an ultrasound guided pancreatic carcinoma mouse model. *Gut* 53: 355-61.
  119. **Sckell A, Leunig M** (2001) Dorsal skinfold chamber preparation in mice: studying angiogenesis by intravital microscopy. *Methods Mol Biol* 1430: 251-63.
  120. **Shepherd BR, Chen HY, Smith CM, Gruionu G, Williams SK, Hoying JB** (2004) Rapid perfusion and network remodeling in a microvascular construct after implantation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 898-904.
  121. **Shepherd BR, Hoying JB, Williams SK** (2007) Microvascular transplantation after acute myocardial infarction. *Tissue Eng* 13: 2871-9.
  122. **Shingu K, Kruschinski C, Lührmann A, Grote K, Tschernig T, Von Hörsten S, Pabst R** (2003) Intratracheal macrophage-activating lipopeptide-2 reduces metastasis in the rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28: 316-21.
  123. **Shivakumar SB, Bharti D, Subbarao RB, Jang SJ, Park JS, Ullah I, Park JK, Byun JH, Park BW, Rho GJ** (2016) DMSO- and serum-free cryopreservation of wharton's jelly tissue isolated from human umbilical cord. *J Cell Biochem* 117: 2397-412.
  124. **Soltysiak P, Saxena AK** (2009) Micro-computed tomography for implantation site imaging during in situ oesophagus tissue engineering in a live small animal model. *J Tissue Eng Regen Med* 3: 573-6.

125. **Steinbauer M, Harris AG, Abels C, Messmer K** (2000) Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg* 385:290-8.
126. **Sterodimas A, Boriani F, Magarakis E, Nicaretta B, Pereira LH, Illouz YG** (2012) Thirtyfour years of liposuction: past, present and future. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 16: 393-406.
127. **Stoltz JF, Bensoussan D, Decot V, Ciree A, Netter P, Gillet P** (2006) Cell and tissue engineering and clinical applications: an overview. *Biomed Mater Eng* 16: 3-18.
128. **Swift ME, Kleinman HK, DiPietro LA** (1999) Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice. *Lab Invest* 79: 1479-87.
129. **Tabuchi A, Mertens M, Kuppe H, Pries AR, Kuebler WM** (2008) Intravital microscopy of the murine pulmonary microcirculation. *J Appl Physiol* 104: 338-46.
130. **Temenoff JS, Mikos AG** (2000) Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering. *Biomaterials* 21: 2405-12.
131. **Tremblay PL, Hudon V, Berthod F, Germain L, Auger FA** (2005) Inosculation of tissue-engineered capillaries with the host's vasculature in a reconstructed skin transplanted on mice. *Am J Transplant* 5: 1002-10.
132. **Vo TN, Kasper FK, Mikos AG** (2012) Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 64: 1292-309.
133. **Vollmar B, Laschke MW, Rohan R, Koenig J, Menger MD** (2001) In vivo imaging of physiological angiogenesis from immature to preovulatory ovarian follicles. *Am J Pathol* 159: 1661-70.
134. **Wang F, Guan J** (2010) Cellular cardiomyoplasty and cardiac tissue engineering for myocardial therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 62: 784-97.
135. **Wang H, Keiser JA, Olszewski B, Rosebury W, Robertson A, Kovcsdi I, Gordon D** (2004) Delayed angiogenesis in aging rats and therapeutic effect of adenoviral gene transfer of VEGF. *Int J Mol Med* 13: 581-7.
136. **Wang H, Listrat A, Meunier B, Gueugneau M, Coudy-Gandilhon C, Combaret L, Taillandier D, Polge C, Attaix D, Lethias C, Lee K, Goh KL, Béchet D** (2014) Apoptosis in capillary endothelial cells in ageing skeletal muscle. *Aging Cell* 13: 254-62.



137. **Wang Y, Iguchi K, Ito H, Ookawa K, Kobayashi N, Nakamura R, Goto Y, Sakai M, Ishikawa S, Onizuka M** (2009) Blood flow velocity is reduced in a tumor micro-dissemination in the visceral pleura in anesthetized open-chest rat lung. *In Vivo* 23: 291-5.
138. **Weber M, Baker MB, Moore JP, Searles CD** (2010) MiR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity. *Biochem Biophys Res Commun* 393: 643-8.
139. **Westermann S, Vollmar B, Thorlacius H, Menger MD** (1999) Surface cooling inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced microvascular perfusion failure, leukocyte adhesion, and apoptosis in the striated muscle. *Surgery* 126: 881-9.
140. **Zarem HA** (1969) The microcirculatory events within full-thickness skin allografts (homografts) in mice. *Surgery* 66: 392-7.
141. **Zeckey C, Tschernig T, Hildebrand F, Frink M, Frömke C, Dorsch M, Krettek C, Barkhausen T** (2010) Macrophage-activating lipopeptide-2 exerts protective effects in a murine sepsis model. *Shock* 33: 614-9.
142. **Zweifach BW** (1973) The microcirculation in the intestinal mesentery. *Microvasc Res* 5: 363-7.

## **9. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denjenigen bedanken, die durch ihre persönliche Unterstützung die Erstellung dieser Dissertation ermöglicht haben.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Michael D. Menger für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes tätig sein zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Matthias W. Laschke, der jederzeit für Rückfragen zur Verfügung stand und durch seine kritische und kompetente Betreuung maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Sascha Kleer für die Einarbeitung in die Operationstechnik und Frau Julia Parakenings, Frau Janine Becker, Frau Ruth Nickels und Frau Dr. Claudia Scheuer für die Unterstützung bei den Laborarbeiten und der Erstellung von histologischen Präparaten.

## 11. Publikationen

### Originalarbeiten

**Grässer C**, Scheuer C, Parakenings J, Tschernig T, Eglin D, Menger MD, Laschke MW (2016) Effects of macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) on the vascularisation of implanted polyurethane scaffolds seeded with microvascular fragments. Eur Cell Mater 32: 74-86.

Laschke MW, **Grässer C**, Kleer S, Scheuer C, Eglin D, Alini M, Menger MD (2014) Adipose tissue-derived microvascular fragments from aged donors exhibit an impaired vascularisation capacity. Eur Cell Mater 28: 287-98.

### Zitierfähige Abstracts

**Grässer C**, Scheuer C, Tschernig T, Eglin D, Menger MD, Laschke MW (2015) Effects of macrophage-activating lipopeptide-2 on the vascularization of implanted vessel-seeded polyurethane scaffolds. Eur Surg Res 55: 268.

#### 19. Chirurgischen Forschungstage, Preisträgersitzung

**Grässer C**, Scheuer C, Eglin D, Menger MD, Laschke MW (2015) Local effects of macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) on the vascularization of implanted polyurethane scaffolds seeded with adipose tissue-derived microvascular fragments. Eur Surg Res 55: 64-5.

#### 132. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie

**Grässer C**, Kleer S, Scheuer C, Eglin D, Menger MD, Laschke MW (2014) Age-dependent regenerative potential of adipose tissue-derived microvascular fragments for the vascularization of tissue engineering scaffolds. Langenbecks Arch Surg 399: 373-4.

#### 131. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie